

# **EL COMPLEJO INFLAMASOMA EN LA INFLAMACIÓN Y DAÑO CARDIACO INDUCIDOS POR LAS DIETAS HIPERCALÓRICAS**

---

Tesis doctoral

Doctorando: Luis Pavillard Rodriguez

Directores: Mario Cordero y Pedro Bullón

Universidad de Sevilla

2018



*With a Little Help from My Friends*

*- The Beatles*

# 1. Agradecimientos

En principio deseo expresar mi agradecimiento a mis directores Mario Cordero y Pedro Bullón, quienes nunca dudaron en mi trabajo y capacidad. Ambos directores actuaron de manera complementaria. Por un lado, Mario Cordero me introdujo en el universo de las ciencias básicas, despertando en mí una pasión por esta disciplina. Por otro lado, Pedro Bullón confió en mi desde el primer momento, acogiéndome como su pupilo, por lo cual le estaré eternamente agradecido. Encontré siempre una puerta abierta cuando necesité su ayuda; las contadas ocasiones en las que no se encontraba disponible, sabía que tocando la puerta de Lucía Maestre hallaría una mano amiga dispuesta a intentar solucionar el problema que tuviese.

A mis compañeras de laboratorio, especialmente a Fabiola Marín y Lourdes Román, por tener la paciencia de enseñarme y ayudarme en todo lo que estaba en sus manos. Sin



ellas las tardes en el laboratorio se hubieran hecho mas largas y mucho menos divertidas.

Otro pilar en el cual se sostiene este trabajo es el grupo de profesionales que integran la facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla. En más de una ocasión esperaron pacientemente a que yo terminase algún test para cerrar la facultad e irse a casa.

En el contexto de la vida cotidiana, mis padres han jugaron un papel muy importante, sobre todo, apoyando mi formación desde el principio y colaborando económicamente durante todo el camino. También a ellos, a mis hermanos y amigos les debo momentos de bienestar y entretenimiento, sin los cuales esta tesis se habría terminado en la mitad de tiempo, pero también podría haberlo mandado todo a “freír espárragos” con mayor facilidad. También debo agradecerles el apoyo, los consejos y la paciencia que han demostrado durante toda

mi etapa universitaria, especialmente durante los últimos años de formación postgraduada.

Por último, y no menos importante, debo de agradecer la ilustración y el diseño de la portada de esta tesis a Jesus Guerra, que amablemente me ha ayudado con los aspectos mas estéticos de este trabajo.

Para finalizar, no debo dejar de reconocer que este trabajo difícilmente hubiese tenido lugar sin la colaboración de las personas e instituciones mencionadas. A todos ellos mi enorme agradecimiento y reconocimiento.

## 2. Resumen

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en el mundo, con una alta prevalencia en los países industrializados. Los factores de riesgo cardiovascular están influenciados principalmente por la dieta, que al igual que otros factores del estilo de vida, pueden modificarse para reducir o aumentar este riesgo. La inflamación ha demostrado ser un factor clave en el progreso biológico de estas enfermedades.

El complejo proteico NLRP3-inflamosoma está involucrado en diversas complicaciones cardio-metabólicas que se caracterizan por un estado inflamatorio sistémico de bajo grado en respuesta a dietas altas en calorías. En la presente investigamos los mecanismos moleculares por los que la inhibición de NLRP3 puede atenuar las lesiones cardíacas inducidas por la dieta.

### 3. Tabla de Contenidos

1. Agradecimientos	4
2. Resumen	7
3. Tabla de Contenidos	8
4. Introducción	11
4.1. Nutrición	11
4.2. La Inflamación	26
4.3. Inflamación y dieta	32
4.4. Inflamación y cardiopatías	33
4.5. Inflamación, diabetes y obesidad	44
4.6. Inflamasoma	46
4.7. NLRP3-inflamasoma	47
5. Objetivos	63
6. Material y métodos	64
6.1. Animales	64
6.2. Declaraciones éticas	65
6.3. Reactivos	66
6.4. Experimentos celulares in vitro	67
6.5. Niveles de IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$	68
6.6. Leptina y adiponectina	68
6.7. Biomarcadores séricos	69
6.8. Inmunotransferencia	69

6.9. Peroxidación lipídica	70
6.10. Proteínas carboniladas	71
6.11. Estudio histológico	71
6.12. PCR cuantitativa en tiempo real	72
6.13. Estadísticas	75
7. Resultados	76
7.1. La ausencia de NLRP3 protege de obesidad inducida mediante HSD, HFD y HSFD	76
7.2. La deficiencia de NLRP3 induce una protección moderada contra el estrés oxidativo en el corazón y la inflamación	84
7.3. Los ratones con inhibición del NLRP3 muestran una protección autofágica contra el daño cardíaco inducido por HSD, HFD y HSFD	93
7.4. Cambios en la expresión génica de moléculas de adhesión y marcadores de fibrosis en el corazón	94
7.5. La inhibición farmacológica de NLRP3 previene la obesidad y el daño cardíaco inducidos por HSD, HFD y HSFD	101
7.6. El suero de ratones alimentados con HSD, HFD y HSFD induce la activación del inflammasoma y de la inflamación en monocitos	119
8. Discusión	126
9. Conclusiones	137
10. Bibliografía	140



## 4. Introducción

### 4.1. Nutrición

Los alimentos no son simplemente el combustible fisiológico. La alimentación es también un fenómeno social. Así, los grandes acontecimientos se celebran con banquetes y, en el otro extremo, se guarda ayuno en la penitencia. En todas las sociedades, y con independencia del área geográfica, nuestros horarios están adaptados a las comidas (Gil & de Medina Contreras, 2005)

Los antiguos griegos ya prestaban especial atención a las cuestiones nutricionales porque creían que la dieta adecuada es una condición previa para el bienestar corporal e intelectual. Fue la experiencia cotidiana lo que les hizo reconocer la importancia de la dieta tanto en la salud como en la enfermedad. De hecho, muchas enfermedades se atribuyeron a una

dieta "no saludable" y la intervención nutricional fue un medio muy común de tratar las diversas dolencias humanas.

Hipócrates (siglo V antes de Cristo), el más eminente médico griego, dedicó su tratado "Sobre la dieta" a la presentación de sus conceptos nutricionales y el papel de la dieta en el tratamiento de enfermedades. La dieta era un problema que interesaba no solo a los médicos, sino también a los filósofos. Las famosas obras filosóficas de Platón, con sus frecuentes referencias a la dieta, son un ejemplo de cómo la comida influyó en casi todos los aspectos de la vida en la antigua sociedad griega.

Sin embargo, la primera evidencia experimental que permitió relacionar la dieta y las enfermedades fue la relación encontrada entre el escorbuto que presentaban los marinos embarcados y la escasez de frutas y verduras frescas en su dieta. El escorbuto es una avitaminosis producida por la deficiencia de vitamina C, que es requerida para la síntesis de colágeno



en los humanos (Gil & de Medina Contreras, 2005). El nombre químico para la vitamina C, ácido ascórbico, proviene de una raíz latina scorbutus. Uno de los primeros brotes de escorbuto en el mar fue sufrido por la tripulación de Vasco da Gama durante su expedición a India en 1497. Da Gama comenzó su expedición desde Lisboa el 9 de julio de 1497, con una flota de 4 barcos y una tripulación de 140 hombres. Les llevó 6 meses rodear el Cabo de Buena Esperanza. Para cuando la tripulación de Da Gama aterrizó en la costa sureste de África, la mayoría de ellos padecían escorbuto. Da Gama registró: "Muchos de nuestros hombres se enfermaron aquí, sus pies y manos se hincharon, y sus encías crecieron sobre sus dientes para que no pudieran comer". Mientras navegaban más arriba en la costa este de África, se encontraron con comerciantes locales, quienes les proporcionaron naranjas frescas. A los 6 días de haber comido las naranjas, la tripulación de da Gama se recuperó por completo y anotó en su diario que "agradó a Dios por su misericordia que ... todos nuestros enfermos recuperaron su salud porque el aire del lugar es muy bueno". Tras 12 sema-

nas de navegación, su tripulación fue afligida y debilitada por el escorbuto. Da Gama comentó: "Dirigimos votos y peticiones a los santos ... agradó a Dios en su misericordia enviarnos un viento que en el curso de seis días, nos llevó a la vista de la tierra ... en esto nos regocijamos. ... esperamos recuperar nuestra salud allí como lo habíamos hecho antes ... el Capitán envió a un hombre a la orilla para traer un suministro de naranjas que eran muy deseadas por nuestros enfermos ". (Rajakumar, 2001)

En los siguientes siglos, se utilizó la experimentación científica para comprender la digestión, la salivación, la respiración, la absorción, el metabolismo, en definitiva, para llegar a conocer el papel biológico de determinados nutrientes (Gil & de Medina Contreras, 2005).

Europa presenta grandes diferencias en cuanto a dietas y prácticas culinarias. También se pueden detectar importantes variaciones en los patrones de morbilidad y mortalidad, a los

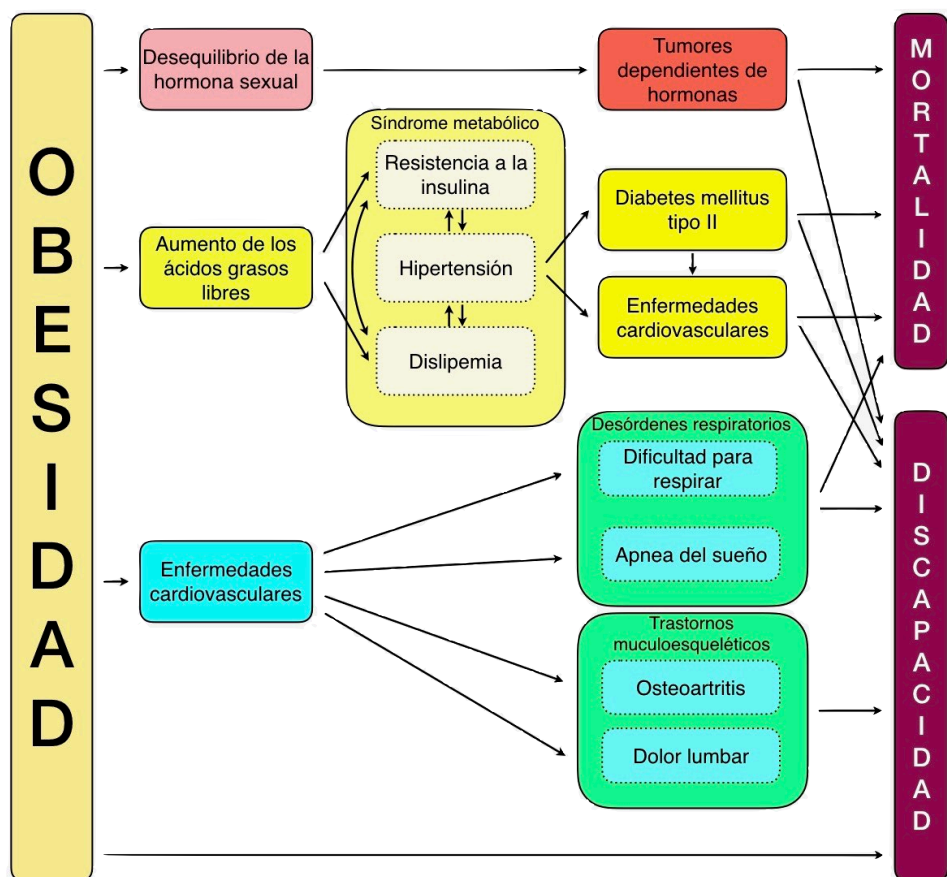
cuales se recurre frecuentemente para llevar a cabo estudios sobre nutrición. El papel de la nutrición humana en la salud pública constituye actualmente una de las grandes áreas de la investigación y de la política sanitaria en los países desarrollados.

Para comprender los cambios sanitarios que se están produciendo en Europa, hay que considerar los cambios en los estilos de vida de sus habitantes y, muy especialmente, de sus hábitos alimentarios. La nutrición en Europa se mueve alrededor de tres escenarios distintos: Europa del Norte, con perfiles nutricionales poco saludables en el pasado, pero que en algunos países se están modificando actualmente; Europa del Este, con unos hábitos alimentarios y unos indicadores sanitarios que empeoran día a día, como consecuencia de unos cambios socioeconómicos muy agudos y de políticas sanitarias pasadas erróneas; y, por último, la Europa Mediterránea, que se debate entre conservar su positiva alimentación tradicional o adoptar patrones dietéticos foráneos, precisamente aquellos que los

propios países anglosajones están tratando de corregir (Gil & de Medina Contreras, 2005).

A mediados de los años 60 del siglo XX, comenzaron a aparecer evidencias que sugerían cómo enfermedades que normalmente no se asociaban a la desnutrición tenían también su origen en la misma. Esto resultó sobre todo evidente para la cardiopatía isquémica, que se ha ido progresivamente revelando cómo una importante causa de mortalidad en muchos países (Anon, 1961). La obesidad ha llegado a tener tal prevalencia que ha constituido un importante problema de salud pública (Visscher & Seidell, 2001). Como puede apreciarse en la **Figura 1**, la obesidad puede aumentar la tasa tanto de mortalidad, como de discapacidad a través de múltiples vías. Los conceptos de nutrición empezaron a cambiar conforme se fueron realizando investigaciones sobre las bases fisiológicas y bioquímicas de enfermedades degenerativas crónicas, y poco a poco se ha revelado que la ingesta de nutrientes se podía relacionar con un determinado número de factores de riesgo, y con el

desarrollo de procesos tan diversos como la cardiopatía isquémica, o el cáncer de colon.



**Figura 1.** El impacto de la obesidad en la salud pública (Visscher & Seidell, 2001).

En los países desarrollados, las principales causas de muerte son las llamadas enfermedades degenerativas, cuyas características más importantes, entre otras, se pueden resumir de la siguiente manera:

1. Sus manifestaciones clínicas aparecen generalmente en la época media de la vida.
2. Presentan una etiología múltiple.
3. Su desarrollo está en relación con el consumo de dietas de elevado valor calórico y abundante contenido en alimentos de origen animal.

Por ello, actualmente tiene lugar el inicio de una nueva era en el estudio de la nutrición humana, y que parte del hecho de que la nutrición y la salud óptima están íntimamente relacionadas.

La hipótesis lipídica propuesta por Grande Covián postula que el efecto de la dieta sobre el desarrollo de la arteriosclerosis se debe a la influencia de la misma sobre los niveles de colesterol plasmáticos (Gil & de Medina Contreras, 2005). En este sentido, en los años 50 y 60 del siglo XX se produce un gran avance para comprender la relación entre la composición de la dieta y estos niveles de colesterol: se trata de los estudios publicados por Keys, Anderson y Grande, en los que demuestran que la relación entre el contenido de grasa de la dieta y el nivel de colesterol se expresaba por una ecuación (Keys, Anderson & Grande, 1965). Estas ecuaciones han permitido, en numerosos estudios, demostrar que la calidad de la grasa de la dieta es fundamental al evaluar su influencia en la etiología y/o prevención de las enfermedades cardiovasculares.

Los nutrientes contenidos en los alimentos, después de digeridos y absorbidos en el epitelio intestinal, entran a la circulación sanguínea y son distribuidos y utilizados en diferentes tejidos con fines de obtención de energía o como elementos



estructurales o reguladores de las funciones biológicas. Los macronutrientes (hidratos de carbono, grasas y proteínas) son utilizados por los tejidos tanto con fines energéticos como estructurales.

Los azúcares son los hidratos de carbono que poseen sabor dulce. El azúcar se ha producido desde tiempos muy remotos. En agosto de 1492, Cristóbal Colón se detuvo en La Gomera, en las Islas Canarias, para tomar vino y agua, con la intención de quedarse solo cuatro días. Se involucró de manera romántica con la gobernadora de la isla, Beatriz de Bobadilla y Ossorio, y se quedó un mes. Cuando finalmente zarpó, ella le dio esquejes de caña de azúcar, convirtiéndose en los primeros en llegar al Nuevo Mundo (Cioranescu, 1955). Aunque no fue hasta el comienzo de la era industrial en Europa, a finales del siglo XVIII, que los cambios en los hábitos de consumo incrementaron la utilización de azúcar como edulcorante de mesa y posteriormente como ingrediente de nuevos alimentos: golo-

sinas, refrescos, helados, productos de bollería, etc (Mintz, 1985).

De todos los azúcares existentes en la naturaleza, sólo unos pocos se utilizan a gran escala como edulcorantes. La sacarosa es, sin duda, el más importante económicamente y, de todas las sustancias orgánicas preparadas industrialmente, la que se obtiene en mayor cantidad.

Los azúcares tienen propiedades físico-químicas que los hacen muy útiles en tecnología alimentaria; su valor nutricional está casi exclusivamente reducido al aporte de calorías, y su consumo va generalmente acompañado de una disminución en el aporte de hidratos de carbono más complejos en la dieta.

Debido a que los refrescos son una fuente importante de consumo de azúcar agregado en la dieta estadounidense, una serie de estudios han explorado el consumo de refrescos y su asociación potencial con una variedad de problemas meta-

bólicos y de salud. Estudios transversales en humanos han relacionado el consumo de refrescos con una nutrición menos óptima, un mayor peso corporal y una mayor ingesta de energía (Rippe & Angelopoulos, 2013). También se ha sugerido que el consumo excesivo de fructosa a partir de azúcares agregados puede desempeñar un papel en las epidemias de enfermedades cardíacas, resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hipertensión, dislipidemia y obesidad. Además, algunos estudios han sugerido que la ingestión de fructosa puede conducir a un aumento de los índices de inflamación (Liu, Manson, Buring, *et al.*, 2002) y estrés oxidativo (Rippe & Angelopoulos, 2013). Las grasas y aceites forman parte de un amplio grupo de alimentos, muy repartidos en el reino animal y vegetal. Desempeñan un importante papel, al contribuir a la palatabilidad, es decir, a ser agradable al paladar, de la dieta. La grasa es el componente de más interés en este sentido y resulta imprescindible en la mayor parte de la preparación de los alimentos.

Los constituyentes mayoritarios de las grasas alimentarias son los triacilglicéridos (triglicéridos), los cuales pueden estar formados por diferentes ácidos grasos, lo que representa en parte su interés nutritivo.

La grasa es un alimento importante para muchas formas de vida y las grasas sirven para funciones estructurales y metabólicas. Son parte necesaria de la dieta de la mayoría de los heterótrofos (incluidos los humanos). Algunos ácidos grasos que son liberados por la digestión de las grasas se llaman esenciales porque no pueden ser sintetizados en el cuerpo a partir de componentes más simples. Hay dos ácidos grasos esenciales (AGE) en la nutrición humana: ácido alfa-linolénico (un ácido graso omega-3) y ácido linoleico (un ácido graso omega-6). Se pueden sintetizar otros lípidos que el cuerpo necesita a partir de estos y otras grasas. Estas son descompuestas en el organismo por enzimas llamadas lipasas producidas en el páncreas.

Las grasas y aceites se clasifican de acuerdo con el número y la unión de los átomos de carbono en la cadena. Las grasas saturadas no tienen dobles enlaces entre los carbonos de la cadena. Las grasas no saturadas tienen uno o más carbonos de doble enlace en la cadena. La nomenclatura se basa en el extremo no ácido (no carbonílico) de la cadena. Este extremo se llama omega end o n-end. Por lo tanto, el ácido alfa-linolénico se denomina ácido graso omega-3 porque el tercer carbono de ese extremo es el primer carbono de doble enlace en la cadena que cuenta desde ese extremo. Algunos aceites y grasas tienen múltiples enlaces dobles y, por lo tanto, se llaman grasas poliinsaturadas. Las grasas no saturadas se pueden dividir en grasas cis, que son las más comunes en la naturaleza, y las grasas trans, que son raras en la naturaleza. Las grasas insaturadas pueden alterarse por reacción con hidrógeno efectuado por un catalizador. Esta acción, llamada hidrogenación, tiende a romper todos los enlaces dobles y hace una grasa completamente saturada. Para hacer acortamiento vegetal, las grasas líquidas insaturadas en cis, como los aceites vegetales, se hi-

drogenan para producir grasas saturadas, que tienen propiedades físicas más deseables, por ejemplo, se funden a una temperatura deseable (30-40°C) y se almacenan bien, mientras que Los aceites poliinsaturados se vuelven rancios cuando reaccionan con el oxígeno en el aire. Sin embargo, las grasas trans se generan durante la hidrogenación como contaminantes creados por una reacción secundaria no deseada en el catalizador durante la hidrogenación parcial. El consumo de tales grasas trans ha demostrado aumentar el riesgo de enfermedad coronaria.

## 4.2. La Inflamación

La inflamación es un proceso fisiológico del sistema inmune para el control de las infecciones y la posterior reparación de los tejidos. Sin embargo, alteraciones en los mecanismos implicados en la inducción de la inflamación se han aso-

ciado con fenómenos inmunopatológicos que alteran el desarrollo normal de muchas funciones vitales. (López & Inchima, 2012)

La inflamación ha surgido recientemente como un aspecto importante de la fisiopatología de la enfermedad relacionada con la edad y las principales enfermedades crónicas de las sociedades industrializadas, incluidas las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus tipo 2, la enfermedad de Alzheimer y muchos tipos de cáncer. (Galland, 2010)

La inflamación inicia la destrucción de patógenos así como los procesos de reparación de tejidos y ayuda a restaurar la homeostasis en localizaciones infectadas o dañadas. Fue tipificada por Aulo Cornelio Celso como enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor, y más tarde fue añadida la pérdida de función. Involucra interacciones entre muchos tipos de células y la producción de varios mediadores químicos y respuestas a ellos. La inflamación está normalmente bien regulada para que

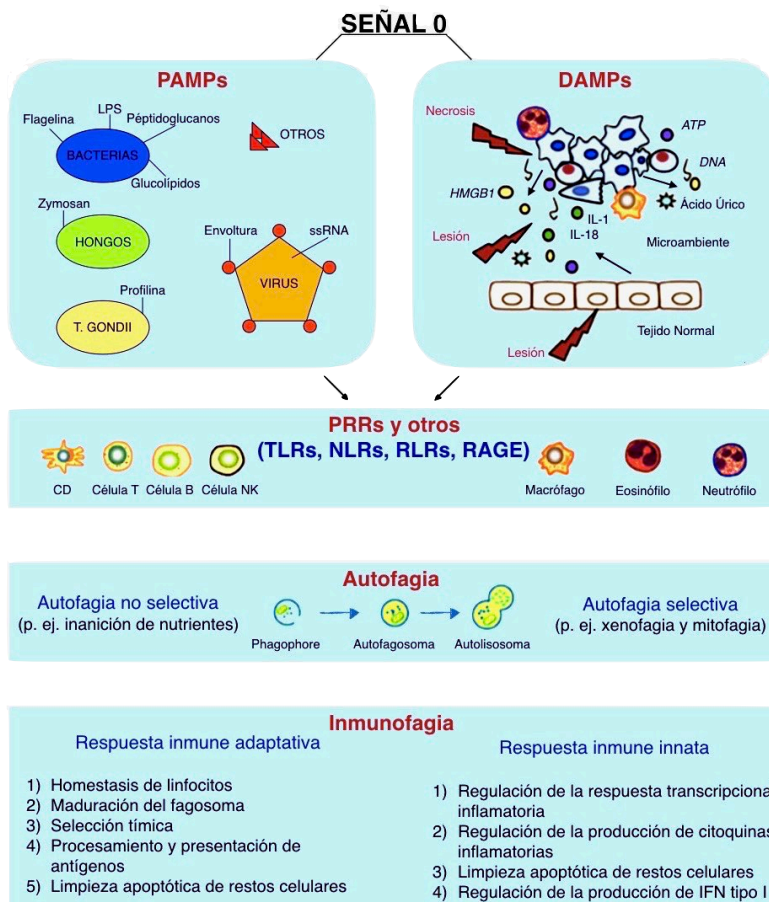
no cause un daño excesivo al huésped, lo que implica la activación de mecanismos de retroalimentación negativa, como la secreción de citoquinas antiinflamatorias, la inhibición de las cascadas de señalización proinflamatorias, la eliminación de receptores para los mediadores inflamatorios y activación de células reguladoras. Cuando esta autorregulación se vuelve excesiva, puede producirse un daño irreparable a los tejidos del huésped, convirtiendo la inflamación en patológica (Calder, Albers, Antoine, *et al.*, 2009). Cuando esto sucede, la inflamación puede volverse continua, desarrollándose a continuación enfermedades inflamatorias crónicas (Ferrero-Miliani, Nielsen, Andersen, *et al.*, 2006).

El peligro está en todas partes. El huésped responde a las llamadas señales de peligro con la inducción de una respuesta (**Figura 2**) inmune innata y luego adaptativa (Tang, Kang, Coyne, *et al.*, 2012). Nuestro cuerpo ha desarrollado mecanismos para detectar patógenos mediante el reconocimiento de motivos moleculares conservados, denominados patrones



moleculares asociados a patógenos (PAMP). La unión de estas moléculas a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como los receptores Toll-like (TLR), desencadena la respuesta del sistema inmune contra el intruso (Janeway, 1989). Sin embargo, esta "teoría del extraño" no podría explicar por qué se producen respuestas inmunes fuertes en condiciones estériles como lesiones isquémicas, traumatismos, tumores, trasplantes de tejidos y enfermedades autoinmunes. Por simetría al concepto PAMP, en 1994, Polly Matzinger propuso la "teoría del peligro" en la que se postulaba que los tejidos lesionados liberaban moléculas intracelulares [patrones moleculares asociados al daño (DAMPs)] que activan el sistema inmune (Matzinger, 1994). Este concepto tiene sus raíces en un ensayo clínico sobre trasplante de riñón, en el que se aprovechó el superóxido dismutasa para eliminar radicales libres de oxígeno para evitar la lesión por reperfusión (Land, Schneeberger, Schleibner, *et al.*, 1994). Sin embargo, durante muchos años la "teoría del peligro" siguió siendo un modelo teórico, hasta que el High Mobility Group Box 1 (HMGB1) y los cristales de ácido

úrico fueron reconocidos como DAMPs (Shi, Evans & Rock, 2003; Scaffidi, Misteli & Bianchi, 2002). Desde entonces, se identificaron muchos más DAMP y sus roles en la salud y la enfermedad ahora se entienden parcialmente (Vénéreau, Ceriotti & Bianchi, 2015).



**Figura 2.** Las señales 0 juegan roles críticos en autofagia e inmunidad. Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y patrones moleculares asociados al peligro (DAMP) sirven como señal 0, induciendo autofagia e inmunofagia (Tang, Kang, Coyne, et al., 2012)

### 4.3. Inflamación y Dieta

El patrón dietético habitual parece tener una influencia moderada sobre la inflamación sistémica crónica de bajo grado, un importante factor de riesgo para las enfermedades del envejecimiento y la industrialización. La evidencia disponible indica que el consumo de magnesio, fibra, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) omega-3 ( $\omega$ -3), ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), flavonoides y carotenoides de los alimentos se asocia con niveles disminuidos de marcadores inflamatorios en el suero, mientras que ácidos grasos saturados (SFAs), ácido trifluoroacético TFA, carbohidratos de alto índice glucémico y una relación de PUFAs  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 alta se asocian con niveles aumentados de inflamación (Galland, 2010).

Cualquier intento de crear una dieta para una salud óptima debe considerar el impacto de la prescripción dietética en la inflamación sistémica. Parte de este impacto se puede atribuir a los efectos directos o indirectos de los nutrientes y al pa-

trón dietético en los componentes de la respuesta inflamatoria en sí misma (Galland, 2010).

La evidencia actual sugiere que los niveles plasmáticos elevados de marcadores inflamatorios, como la proteína C-reactiva (PCR), la interleuquina (IL) -6 y el factor de necrosis tumoral (TNF), son factores de riesgo para muchas enfermedades crónicas, incluida la obesidad (Williams & Tabas, 2002; Ramos, Xu, Romanova, *et al.*, 2003), diabetes (Dandona, Aljada, Chaudhuri, *et al.*, 2005), síndrome metabólico (Panagiotakos, Pitsavos, Yannakoulia, *et al.*, 2005) y muchos tipos de enfermedades cardiovasculares (Theuma & Fonseca, 2003; Haffner, 2006).

#### **4.4. Inflamación y Cardiopatías**

El síndrome de insuficiencia cardíaca (IC) es el resultado de diversas alteraciones estructurales o funcionales de la acti-

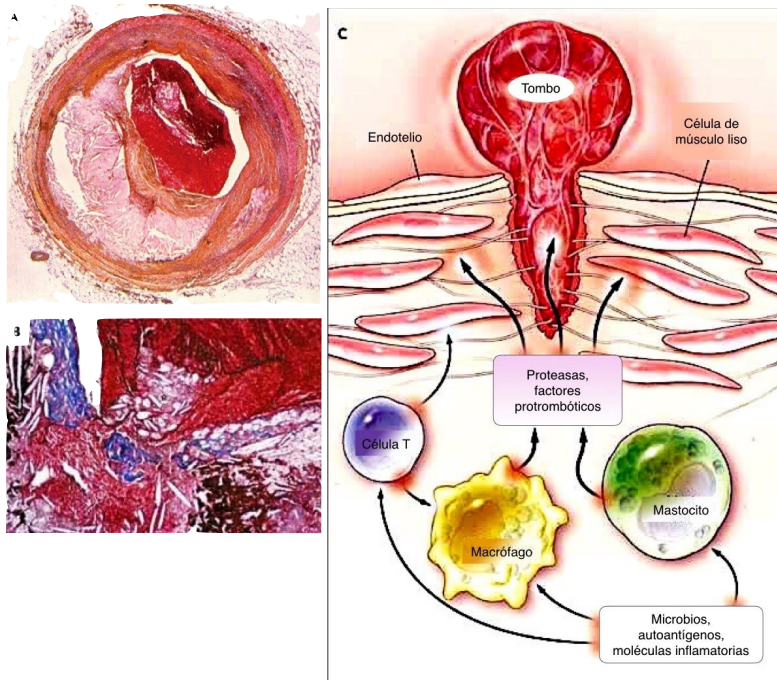
vidad cardíaca que conducen a la incapacidad de mantener el gasto cardíaco a presiones de llenado normales. La insuficiencia cardíaca sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en los Estados Unidos y es la principal causa de hospitalización entre las personas mayores de 65 años, lo que lleva a que los costos de atención excedan los 31 mil millones de dólares anuales. En las últimas dos décadas, los avances en terapias farmacológicas y de dispositivos para la IC han mejorado significativamente el pronóstico para pacientes con insuficiencia cardíaca con baja fracción de eyección, sin embargo, el pronóstico general sigue siendo pobre para estos pacientes con tasas de mortalidad cercanas al 50% en 5 años. Por lo tanto, la atenuación de la progresión de la IC sigue siendo un objetivo importante. La identificación de vías novedosas y la intervención eficaz en objetivos terapéuticos potenciales pueden ralentizar la progresión de la IC. Se sabe que la insuficiencia cardíaca se asocia con una inflamación crónica de bajo grado que conduce a una remodelación cardíaca adversa (Brittany

Butts, Rebecca A Gary, Sandra B Dunbar, *et al.*, 2015; Abbate, 2013).

Los estudios con inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), betabloqueantes y antagonistas de la aldosterona han mostrado beneficios en pacientes con insuficiencia cardíaca con baja fracción de eyección (Packer, 1992). Sin embargo, el alto riesgo persistente de mortalidad entre estos pacientes sugiere que la activación neurohormonal no explica completamente la progresión de la insuficiencia cardíaca. Las citoquinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleuquina 1 (IL-1) y 6 (IL-6) y la proteína C reactiva (PCR) aumentan en la insuficiencia cardíaca y sus niveles están relacionados con la severidad y el pronóstico de la insuficiencia cardíaca (Seta, Shan, Bozkurt, *et al.*, 1996). Se cree que estas citoquinas modulan la remodelación miocárdica, la hipertrofia y la apoptosis de miocitos, la contractilidad disminuida, el aumento de la fibrosis y otros cambios estructurales adversos (Hofmann & Frantz, 2013; El-Menyar, 2008; Chung,

Packer, Lo, *et al.*, 2003). Estos hallazgos han llevado a la "hipótesis de las citoquinas" sobre la progresión de la IC (Seta, Shan, Bozkurt, *et al.*, 1996; El-Menyar, 2008). Originalmente se consideró que las citoquinas inflamatorias en la IC representaban un síntoma secundario de la enfermedad, sin embargo, la evidencia reciente sugiere su papel mecanicista (Haehling, Schefold, Lainscak, *et al.*, 2009). Los estudios iniciales de IC se centraron en las citoquinas individuales, sin embargo, descubrir los procesos fisiopatológicos de la remodelación miocárdica requiere un estudio adicional de las vías inflamatorias y los mecanismos subyacentes de activación de citoquinas (Brittany Butts, Rebecca A Gary, Sandra B Dunbar, *et al.*, 2015).





**Figura 3. Lesión aterosclerótica en una arteria humana** (Hansson, 2005).

El panel **A** muestra una arteria coronaria de sección transversal de un paciente que murió de un infarto de miocardio masivo. Contiene un trombo oclusivo superpuesto a una placa aterosclerótica rica en lípidos. La capa fibrosa que cubre el núcleo rico en lípidos se ha roto, exponiendo el núcleo trombogénico a la sangre.

*El panel **B** es una micrografía que muestra que el contenido de la placa ateromatosa filtrado hacia la luz de la arteria, a través de una rotura en el casquete de células musculares lisas que la rodean. Esto sugiere que la rotura precedió a la trombosis.*

*El Panel **C** ilustra las consecuencias de la activación de las células inmunes en una placa coronaria. Los microorganismos, autoantígenos y diversas moléculas inflamatorias pueden activar células T, macrófagos y mastocitos, lo que conduce a la secreción de citoquinas inflamatorias (por ejemplo, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF)), que a su vez reducen la estabilidad de la placa. La activación de los macrófagos y los mastocitos también provoca la liberación de metaloproteinasas y proteasas de cisteína, que atacan directamente al colágeno y a otros componentes de la matriz tisular. Estas células también pueden producir factores pro-trombóticos y procoagulantes que precipitan directamente la formación de trombos en la localización de rotura de la placa.*

Las lesiones ateroscleróticas (placa de ateroma) son engrosamientos focales asimétricos de la capa más interna de la arteria, la túnica íntima (**Figura 3**). Se componen de células, elementos del tejido conectivo, lípidos y desechos (Sary, Chandler, Dinsmore, *et al.*, 1995). Las células inflamatorias e inmunes transmitidas por la sangre constituyen una parte importante de una placa de ateroma, siendo el resto células del músculo endotelial vascular y del músculo liso. La placa está precedida por una estría grasa, una acumulación de células cargadas de lípidos debajo del endotelio (Sary, Chandler, Glasgow, *et al.*, 1994). La mayoría de las células en la estría grasa son macrófagos, junto con algunas células T. Las estrías grasas son frecuentes en los jóvenes, nunca causan síntomas y pueden progresar a ateroma o eventualmente desaparecer (Hansson, 2005)

En el centro de un ateroma, las células esponjosas junto con gotas de lípidos extracelulares forman una región central, que está rodeada por un casquete de células musculares lisas y

una matriz rica en colágeno. Las células T, los macrófagos y los mastocitos se infiltran en la lesión y son particularmente abundantes en la región más protuberante del ateroma (Kovanen, Kaartinen & Paavonen, 1995; Jonasson, Holm, Skalli, *et al.*, 1986; Stary, Chandler, Dinsmore, *et al.*, 1995). Muchas de las células inmunes exhiben signos de activación y producen citoquinas inflamatorias (Frostegård, Ulfgren, Nyberg, *et al.*, 1999; Kovanen, Kaartinen & Paavonen, 1995; Hansson, Holm & Jonasson, 1989; van der Wal, Becker, van der Loos, *et al.*, 1994).

El infarto de miocardio ocurre cuando el proceso ateromatoso impide el flujo sanguíneo a través de la arteria coronaria. Anteriormente se pensaba que el estrechamiento progresivo de la luz arterial causado por el crecimiento continuo de células de músculo liso en la placa era la principal causa de infarto. Los estudios angiográficos, sin embargo, han identificado lesiones que no causan estenosis marcadas (Hackett, Davies & Maseri, 1988) y, hoy en día, es evidente que es la rotura de la placa, en lugar de la estenosis, la que precipita la isque-

mia y el infarto (**Figura 3**). El espasmo coronario puede estar involucrado hasta cierto punto, pero la mayoría de los casos de infarto se deben a la formación de un trombo oclusivo en la superficie de la placa (Davies, 1996).

Hay dos causas principales de trombosis coronaria: ruptura de placa y erosión endotelial. La ruptura de la placa, que es detectable en el 60-70% de los casos (Falk, Shah & Fuster, 1995), es peligrosa porque expone el material pro-trombótico del núcleo de la placa (fosfolípidos, factor tisular y moléculas de la matriz plaquetaria-adhesiva) a la sangre (**Figura 3**). Las rupturas se producen principalmente cuando la capa fibrosa es delgada y está parcialmente destruida. En estas localizaciones, las células inmunitarias activadas son abundantes (van der Wal, Becker, van der Loos, *et al.*, 1994). Producen numerosas moléculas inflamatorias y enzimas proteolíticas que pueden debilitar la capa fibrosa y activar las células en el núcleo, transformando la placa estable en una estructura vulnerable e inestable que puede romperse, inducir un trombo y desencadenar

un síndrome coronario agudo (**Figura 3**). Para comprender cómo puede ocurrir esto, necesitamos identificar los pasos clave que conducen desde una pared arterial normal a una placa aterosclerótica propensa a la ruptura.

El papel de la inflamación en la fisiopatología en etapa temprana de los eventos aterotrombóticos se ha reconocido durante más de 20 años. El reclutamiento de leucocitos en el compartimiento sub-endotelial de arterias dañadas inicia una cascada de eventos mediados por mediadores inflamatorios derivados de leucocitos. En particular, las quimioquinas y las citoquinas propagan la aterosclerosis a través de (1) aumento de la producción de quimiocinas y expresión de moléculas de adhesión endotelial, estimulando el reclutamiento leucocitario adicional, (2) promoviendo la formación de células esponjosas cargadas de lípidos, (3) iniciando la proliferación de células del músculo liso y (4) inducir inestabilidad de la placa y eventual ruptura (Hallenbeck, Hansson & Becker, 2005; Hansson, 2005; Minihane, Vinoy, Russell, *et al.*, 2015).

Los estudios en animales de experimentación y humanos demuestran que los leucocitos sanguíneos se localizan muy temprano en las lesiones ateroscleróticas durante la historia natural de la enfermedad. El endotelio saludable por lo general no permite la unión de estas células. Sin embargo, en ciertas circunstancias (por ejemplo, una dieta aterogénica u obesidad), y posiblemente mediadas por citoquinas, el endotelio expresa moléculas de adhesión que pueden facilitar la unión a clases específicas de leucocitos, activando la inflamación (Theuma & Fonseca, 2003).

Las citoquinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$  y la interleuquina 6 (IL-6), provocan la fosforilación del inhibidor  $\kappa$ B y la posterior translocación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) al núcleo. El NF- $\kappa$ B intranuclear, induce la transcripción de genes proinflamatorios, incluyendo interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1), y las quimiocinas como la proteína quimioatrayente de mono-

cyto-1 (MCP-1) y CRP (Barnes & Karin, 1997). VCAM-1 se une tanto a los monocitos como a los tipos celulares de linfocitos T que se encuentran consistentemente en ateromas de estadios tempranos y experimentales (Theuma & Fonseca, 2003).

## 4.5. Inflamación, Diabetes y Obesidad

El papel de la obesidad es especialmente relevante porque los mecanismos fisiopatológicos multifactoriales interrelacionan esta condición con otras enfermedades como la diabetes tipo 2, la enfermedad renal y el síndrome metabólico. Todas estas complicaciones inducidas por la obesidad comparten una respuesta sistémica de bajo grado caracterizada por la producción de citoquinas elevadas y las vías de señalización activadas (Minihane, Vinoy, Russell, *et al.*, 2015).



Los mecanismos potenciales que conducen al estado inflamatorio para producir resistencia a la insulina fueron descritos por primera vez por Hotamisligil et al. (Hotamisligil, 2006). Estos autores demostraron que la fosforilación de la serina inducida por TNF- $\alpha$  del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), que a su vez causaba la fosforilación de la serina del receptor de insulina. Esto evitaba la fosforilación de la tirosina normal del receptor de insulina y, por lo tanto, interfería con la transducción de señal de la insulina. Recientemente se ha demostrado que IL-6 y TNF- $\alpha$  inducen un supresor de señalización de citoquinas 3 (SOCS-3) (Senn, Klover, Nowak, *et al.*, 2003; Emanuelli, Peraldi, Filloux, *et al.*, 2001), una proteína que se pensaba que interfería con la transducción de señales de citoquinas, pero que ahora se sabe que además interfiere con la fosforilación de la tirosina del receptor de insulina y el IRS-1 y causa ubiquitinación y degradación proteosómica del IRS-1 (Rui, Yuan, Frantz, *et al.*, 2002). Esto, a su vez, reduce la activación de la proteína quinasa B (Akt), que normalmente causa la translocación del transportador de glucosa sensible a la insuli-

na, transportador de glucosa tipo 4 (Glut-4), a la membrana plasmática. También induce la fosforilación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y su activación para generar óxido nítrico (NO) (Dimmeler, Fleming, Fisslthaler, *et al.*, 1999). También se ha demostrado que la proteína TRB3, interfiere con la activación de Akt y, por lo tanto, interfiere con la acción de la insulina (Du, Herzig, Kulkarni, *et al.*, 2003); sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado la asociación de la proteína TRB3 con mecanismos inflamatorios (Dandona, Aljada, Chaudhuri, *et al.*, 2005).

## 4.6. Inflamasoma

El inflamasoma es un complejo de proteínas citosólicas compuesto por un dominio de unión a nucleótidos y proteínas que contienen repeticiones ricas en leucina (NLR) o ausente en melanoma 2 (AIM2), ASC y caspasa-1, y es un regulador central de la inmunidad e inflamación innatas (Martinon, Mayor & Ts-

chopp, 2009). El inflammasoma se ensambla en respuesta a la infección de patógenos o señales de "peligro" y promueve la maduración y la liberación de varias citoquinas proinflamatorias, incluidas la interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-18 e IL-33. El inflammasoma está, por lo tanto, involucrado en la patogénesis de varios trastornos inflamatorios, como la diabetes, la aterosclerosis y la artritis (Davis, Wen & Ting, 2011; Schroder, Zhou & Tschopp, 2010; Strowig, Henao-Mejia, Elinav, *et al.*, 2012), lo que sugiere que la activación del NLRP3-inflammasoma debe ser estrictamente controlada (Yan, Jiang, Spinetti, *et al.*, 2013).

## 4.7. NLRP3-Inflammasoma

De todos los inflammasomas NLR, el NLRP3 (**Figura 4**) (anteriormente cryopyrin, CIAS1, NALP3) es el más ampliamente estudiado (Franchi, Muñoz-Planillo & Nuñez, 2012; Tschopp & Schroder, 2010). El complejo NLRP3-inflammasoma se ha des-

crito como un "sensor de peligro", que desencadena una respuesta inmune innata frente a una multitud de patrones endógenos de peligro metabólico que inducen inflamación estéril (Youm, Grant, McCabe, *et al.*, 2013). El NLRP3-inflamasoma se forma después de la detección indirecta de agresiones no estériles derivadas de patógenos (PAMP) y estériles (DAMP). Estas van desde productos bacterianos, ADN mitocondrial, virus y Adenosin trifosfato (ATP) hasta partículas como cristales y amiloides (He, Hara & Nuñez, 2016).



**Figura 4.** Representación esquemática de la estructura del NLRP3-inflamasoma. (Pavillard, Marín-Aguilar, Bullón, et al., 2018)

#### 4.7.1. Activación del NLRP3-Inflamasoma

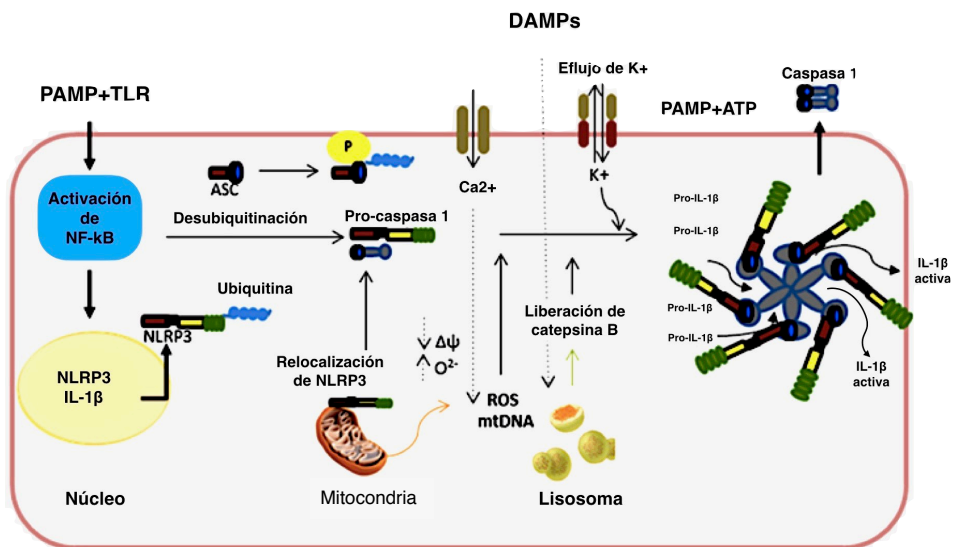
La activación de NLRP3 induce el reclutamiento y la activación autocatalítica de la cisteína proteasa caspasa-1, que procesa los precursores citosólicos de las citoquinas relacionadas IL-1 $\beta$  e IL-18 y conduce a la secreción de la forma biológicamente activa de estas citoquinas (Stienstra, van Diepen, Tack, *et al.*, 2011).

La activación de NLRP3 necesita células para recibir dos señales secuenciadas diferentes. El primero se conoce por "cebado" y activa el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), responsable de inducir la expresión de genes que codifican citoquinas. Las moléculas microbianas (por ejemplo, lipopolisacárido bacteriano (LPS)) o citoquinas del huésped (por ejemplo, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), (Bauernfeind, Horvath, Stutz, *et al.*, 2009; Franchi, Eigenbrod & Nuñez, 2009) pueden funcionar como la señal uno o señal de cebado. El NLRP3-inflamasoma, también se activa por un mecanismo de desubiquitinación de dos pasos

iniciado por la señalización de receptores Toll-like y especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondrial y potenciado adicionalmente por ATP (Juliana, Fernandes-Alnemri, Kang, *et al.*, 2012). Los ácidos grasos libres (FFA) también son capaces de cebar el NLRP3-inflamasoma mediante la señalización de TLR. Además, la lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL) activa el NLRP3-inflamasoma a través de un complejo de señalización CD36-TLR4-TLR6. CD36 también ayuda a la conversión intracelular de oxLDL a cristales de colesterol, que rompen el fagolisosoma y posteriormente activan el NLRP3-inflamasoma a través de la liberación de catepsina (Guo, Callaway & Ting, 2015). La ubiquitinación y la fosforilación de la proteína adaptadora ASC deben ocurrir antes del ensamblaje del inflamasoma (Rodgers, Bowman, Fujita, *et al.*, 2014). Después del cebado, la activación canónica de NLRP3-inflamasoma necesita una segunda señal distinta que activa completamente el NLRP3, lo que lleva al ensamblaje del complejo. Los estímulos activadores más aceptados de NLRP3-inflamasoma incluyen la relocalización de NLRP3 a las mitocondrias y la detección de elemen-

tos mitocondriales liberados en el citosol. Estos incluyen especies de oxígeno reactivas mitocondriales (ROS) que también pueden causar daño a los lisosomas mediado por NLRP3 a través de la permeabilización y subsecuente liberación de catepsina tras la desestabilización de las membranas lisosomales, ADN mitocondrial o interacción de cardiolipina con NLRP3 debido a la translocación de la membrana mitocondrial interna a externa (Vanaja, Rathinam & Fitzgerald, 2015; Lamkanfi & Dixit, 2014; Sutterwala, Haasken & Cassel, 2014) (**Figura 5**). Recientemente, se ha concluido que el NLRP3 activado se junta con ASC a través de interacciones PYD-PYD (dominio PYRIN). El ensamblaje del inflamasoma se completa una vez que la caspasa-1 está activa a través de las interacciones CARD-CARD (activación de caspasa y dominio de reclutamiento), lo que permite la activación autoproteolítica de procaspasa-1 (Lu, Magupalli, Ruan, *et al.*, 2014; Cai, Chen, Xu, *et al.*, 2014). Posteriormente, la caspasa-1 activa se divide y desencadena la activación de la vía del interferón tipo I y la liberación de citoquinas proinflamatorias (Rodgers, Bowman, Fujita, *et al.*, 2014).





**Figura 5. Imagen representativa de la activación de NLRP3 que muestra la participación de diferentes orgánulos y moléculas.**

Como se mencionó en el texto principal, el NLRP3 puede activarse mediante una amplia gama de estímulos. Ca<sup>2+</sup> es un activador crucial de NLRP3 que demuestra que su movilización puede desencadenar un daño mitocondrial, lo que lleva a un aumento en la producción de ROS y una disminución en el potencial de membrana, así como la liberación de ADN mitocondrial en el citosol (Pavillard, Marín-Aguilar, Bullón, et al., 2018).

Recientemente, los flujos iónicos como el flujo de salida de  $K^+$  y la movilización de  $Ca^{2+}$  también se han propuesto como eventos cruciales en la activación del NLRP3-inflamasoma (**Figura 5**). Por lo tanto, la disminución de  $K^+$  intracelular puede activar el NLRP3-inflamasoma. Cómo el  $K^+$  puede regular este proceso no se entiende bien. Se requiere flujo de salida de  $K^+$  para la unión de NEK7 a NLRP3, un paso importante en la activación de NLRP3. Además, el eflujo de  $K^+$  puede inducir la disfunción mitocondrial y la producción de mtROS con activación evidente de NLRP3-inflamasoma (Vanaja, Rathinam & Fitzgerald, 2015). También se ha propuesto que la movilización del  $Ca^{2+}$  tiene un papel en la activación del NLRP3-inflamasoma después de múltiples estímulos (Murakami, Ockinger, Yu, *et al.*, 2012). Se ha demostrado que el bloqueo de la movilización del  $Ca^{2+}$  inhibe la ensamblaje y la activación de NLRP3. Por lo tanto, la movilización de  $Ca^{2+}$  por estímulos como el tratamiento con ATP induce la activación de NLRP3 por la disfunción mitocondrial (**Figura 5**).

## 4.7.2. Inhibidores del NLRP3-inflamasoma

Por lo tanto, una de las estrategias terapéuticas más prometedoras debería ser controlar el NLRP3-inflamasoma. Sabemos que la eliminación genética del NLRP3-inflamasoma en ratones protege contra enfermedades cardiovasculares (Duewell, Kono, Rayner, *et al.*, 2010), neurológicas (Heneka, Kummer, Stutz, *et al.*, 2013) y metabólicas (Wen, Gris, Lei, *et al.*, 2011) protegiendo también contra el deterioro funcional relacionado con la edad (Youm, Grant, McCabe, *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta estos diversos efectos beneficiosos, los investigadores se centran activamente en los antagonistas de NLRP3.

### 4.7.2.1. Antagonistas de IL-1 $\beta$

El tipo más utilizado de terapéutica asociada a inflammasoma hasta la fecha implica a la Anakinra, un fármaco utilizado para tratar la artritis reumatoide que actúa como antago-

nista del receptor de interleuquina-1 (IL-1) y compuestos relacionados. Estos agentes se dirigen directamente a la señalización de IL-1 $\beta$  para detener las enfermedades relacionadas con inflamasoma (Dinarello & van der Meer, 2013). Los antagonistas de IL-1 $\beta$  ya están en uso clínico para tratar enfermedades tales como la gota y los síndromes genéticos tales como el síndrome de Muckle-Wells (caracterizado por mutaciones en el gen NLRP3 que produce una respuesta inflamatoria anormal). El Estudio de los resultados de la trombosis antiinflamatoria de Canakinumab (CANTOS) está destinado a valorar la eficacia del canakinumab, un anticuerpo que inhibe selectivamente la IL-1 $\beta$ , para reducir la inflamación de la placa y el riesgo de CVD (Ridker, Thuren, Zalewski, *et al.*, 2011). La investigación proporcionará evidencia indirecta de los beneficios de atenuar la formación de inflamasoma. Además, dado que el canakinumab no afecta los parámetros lipídicos, el estudio proporcionará pruebas de los beneficios de atacar la inflamación en la enfermedad arterial coronaria (Ridker, Howard, Walter, *et al.*, 2012). Sin embargo, los antagonistas de IL-1 $\beta$  no se dirigen directa-

mente a la molécula o complejo NLRP3 y, por lo tanto, no abordarían IL-18 como la otra citoquina activada por inflamasoma.

#### 4.7.2.2. Inhibición de caspasa-1

Los resultados antiateroscleróticos de la inhibición de caspasa-1 en modelos animales no son claros. Menu et al. compararon ratones doble knockout  $\text{ApoE}^{-/-} / \text{Nlrp3}^{-/-}$ ,  $\text{ApoE}^{-/-} / \text{Pycard}^{-/-}$  y  $\text{ApoE}^{-/-} / \text{Casp1}^{-/-}$  con una dieta alta en grasas durante 11 semanas y posteriormente determinaron el desarrollo de la aterosclerosis y el fenotipo de placa en comparación con ratones  $\text{ApoE}^{-/-}$  (Menu, Pellegrin, Aubert, et al., 2011). Los autores no encontraron diferencias en el desarrollo de la aterosclerosis, la infiltración de macrófagos o la estabilidad de la placa. Como se mencionó anteriormente, el modelo y la elección de la dieta aterogénica podrían haber influido en estos resultados. Sin embargo, Usui et al. demostraron disminución de la inflamación vascular y lesiones ateroscleróticas en ratones con doble

knockout ApoE/caspasa-1 (Usui, Shirasuna, Kimura, *et al.*, 2012). Del mismo modo, Gage *et al.* observó una disminución en la aterosclerosis a pesar de los niveles de lípidos comparables en ratones caspasa-1 / ApoE de doble knockout en comparación con ratones ApoE-knockout (Gage, Hasu, Thabet, *et al.*, 2012). La diferencia en estos estudios se ha atribuido a la desigualdad en la composición de la dieta. A pesar del hecho de que la división de la pro-IL-1 $\beta$  intracelular es principalmente una responsabilidad de la caspasa-1, existen otras proteasas como la elastasa de los neutrófilos que pueden procesar las formas pro-IL en citoquinas activas (Hazuda, Strickler, Kuepers, *et al.*, 1990; Alfaidi, Wilson, Daigneault, *et al.*, 2015). Los ratones deficientes en caspasa-1 tienen cantidades bajas, pero comparables, de IL-1 $\beta$  circulante activa en comparación con los controles de wild type tras la realización de una ligadura carotídea y no presentan una disminución estadísticamente significativa en el desarrollo de la neoíntima (Chamberlain, Evans, King, *et al.*, 2006). Por lo tanto, el efecto de la inhibición de la caspasa-1 en la aterosclerosis es incierto.

#### 4.7.2.3. Inhibición de NLRP3

Los datos preliminares en animales sugieren que inhibir el NLRP3 en sí mismo puede ser potencialmente útil. El silenciamiento de NLRP3 ha demostrado que frena la aterosclerosis y estabiliza la progresión de la placa en ratones con deficiencia de ApoE (Zheng, Xing, Gong, *et al.*, 2014). El Arglabin, un inhibidor anti-inflamasoma, ha demostrado disminuir la inflamación y la aterosclerosis en ratones con apoE-knockout (Abderrazak, Couchie, Mahmood, *et al.*, 2015). Se ha identificado recientemente una molécula potente que inhibe específicamente el NLRP3-inflamasoma, el compuesto MCC950 (Coll, Robertson, Chae, *et al.*, 2015). Se descubrió que esta molécula detiene las enfermedades empíricas relacionadas con la activación del NLRP3-inflamasoma, así como la restricción ex vivo del inflamasoma en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes que padecen mutaciones asociadas a criopirina (CAPS-associated) (Coll, Robertson, Chae, *et al.*, 2015). Sólo un estudio ha examinado cómo MCC950 afecta la progre-

sión de la lesión aterosclerótica en ratones ApoE<sup>-/-</sup>, lo que demuestra que la administración de MCC950 puede reducir significativamente las lesiones ateroscleróticas (van der Heijden, Kritikou, Venema, *et al.*, 2017). Recientemente, probamos el efecto de MCC950 en ratones alimentados con dietas altas en grasa (HFD), dietas altas en azúcar (HSD) y dietas altas en grasa y azúcar (HSFD). Observamos un impacto protector muy alto de MCC950 en el daño cardíaco dependiente de dietas, que se asoció a una mejora del flujo autofágico por MCC950, que también se reprodujo, en experimentos in vitro (Wang, Chen, Li, *et al.*, 2016). Curiosamente, Yan et al. han encontrado que el neurotransmisor dopamina suprime el NLRP3-inflamasoma a través de la activación de la E3-ligasa mediada por el receptor D1 de dopamina que da como resultado la degradación dependiente del proteasoma de NLRP3 (Yan, Jiang, Liu, *et al.*, 2015). El monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) muestra una regulación a la baja del receptor de dopamina D1 para ejercer sus efectos inhibidores. Además, este metabolito se ha relacionado con la inhibición del inflammasoma en diferentes



estudios (Sokolowska, Chen, Liu, *et al.*, 2015). Yan *et al.*, También han identificado un mecanismo que explica cómo los ácidos grasos (FA) omega-3 ( $\omega$ -3) pueden ejercer propiedades antiinflamatorias mediante la inhibición del inflamasoma (Yan, Jiang, Spinetti, *et al.*, 2013). Los  $\omega$ -3FA pueden inhibir la activación del inflamasoma en varios pasos, al bloquear tanto la "señal 1" como la "señal 2". Además, también se ha observado que  $\omega$ -3FA puede reprimir la señalización de NF- $\kappa$ B (Glass & Olefsky, 2012). Recientemente, se ha demostrado que existen otros compuestos interesantes que inhiben la activación de NLRP3 por diferentes mecanismos que se deben evaluar en la protección del daño cardiovascular inducido por la dieta occidental. Se ha estudiado el metabolito cetónico  $\beta$ -hidroxibutirato como inhibidor específico del NLRP3-inflamasoma al evitar el flujo de salida de  $K^+$  y reducir la oligomerización de ASC (Youn, Nguyen, Grant, *et al.*, 2015). El Tranilast, un viejo fármaco clínico antialérgico, inhibe la oligomerización de NLRP3 evitando el ensamblaje y aumentando el peso corporal y la supervivencia de Ratones mutantes NLRP3 con expresión específica

de la mutación Nlrp3 asociada a MWS (síndrome Muckle-Wells). Estos ratones morían en el periodo neonatal cuando no se les administraba dicho fármaco (Huang, Jiang, Chen, *et al.*, 2018). El CY-09 se empareja con el elemento de unión a ATP del dominio NACHT NLRP3 e inhibe la actividad de NLRP3 ATPasa, con el efecto de la supresión del ensamblaje de NLRP3-inflamasoma (Jiang, He, Chen, *et al.*, 2017). Finalmente, se ha demostrado que varios compuestos y procesos conocidos desde hace tiempo inhiben NLRP3 por proceso indirecto. A este respecto, debemos destacar la metformina, el resveratrol, la restricción calórica o la rapamicina (Cordero, Williams & Ryffel, 2018).

## 5. Objetivos

1. ¿La inhibición del NLRP3-inflamasoma produce algún efecto beneficioso a nivel metabólico o inflamatorio en el corazón?
2. ¿Podría el uso de inhibidores del inflamasoma como el MC-C950 utilizarse como terapia para reducir el daño cardíaco y los cambios metabólicos que genera la ECV?
3. En caso de que las dietas induzcan un aumento de los marcadores de inflamación en el suero, ¿se podría inducir un fenotipo inflamatorio en otras células?

## 6. Material y métodos

### 6.1. Animales

Para todos los experimentos, solo se usaron ratones machos. Se mantuvieron 20 ratones C57/BL6/J y 20 ratones transgénicos NLRP3<sup>-/-</sup> (fondo C57BL / 6J), con un peso de 25-30 g, en un ciclo regular de luz/oscuridad de 12 h. Las dietas se iniciaron a las 16 semanas de edad después de la aleatorización en cuatro grupos. Estos grupos corresponden a los siguientes regímenes dietéticos: i) dieta regular o dieta estándar (SD) (n=5) [Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Laboratories (ratio carbohidrato:proteína:grasa de 48:14:4 % de kcal)]; ii) una dieta alta en grasa (HFD) (n=5) que consiste en Teklad Global modificado para proporcionar el 45% de las calorías de la grasa; iii) una dieta rica en azúcar (HSD) (n=5) que consiste en Teklad Global modificada para proporcionar el 32% de las calorías de sacarosa; iv) y una dieta alta en

grasa y azúcar (HSFD) (n=5) que consiste en Teklad Global con la combinación de grasa y sacarosa. Se inyectó MCC950 a otros cuatro grupos, con el mismo número de animales y las mismas dietas, en dosis diarias de 20 mg/kg (fármaco/kg de peso corporal). Todos los grupos tuvieron acceso ad libitum a su dieta y agua prescritas durante todo el estudio. El peso corporal y la ingesta de alimentos se controlaron semanalmente. Las habitaciones de los animales se mantuvieron a 20-22°C con 30-70% de pariente.

## 6.2. Declaraciones éticas

Los estudios en animales se realizaron de acuerdo con las directrices de la Unión Europea (2010/63/UE) y las regulaciones españolas correspondientes para el uso de animales de laboratorio en experimentos crónicos (RD 53/2013 sobre el cuidado de animales de experimentación). Todos los

experimentos fueron aprobados por el comité institucional local de cuidado de animales.

### 6.3. Reactivos

Los anticuerpos monoclonales específicos para Beclin-1 y p62 fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE. UU.). El anticuerpo monoclonal anti-GAPDH fue adquirido de Calbiochem-Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, Reino Unido). El anticuerpo anti-NLRP3 fue obtenido en Adipogen (San Diego, EE. UU.); mientras que la caspasa-3 anti-activa, anti-SIRT-1 y anti-Parkin fueron obtenidas de Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EE. UU.). Finalmente, los anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  (p17), anti-OGG-1, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-MnSOD, anti-catalasa, anti-ATG12 y anti-MAP-LC3 fueron proporcionados por Santa Cruz Biotechnology. Se adquirió un cóctel de inhibidores de proteasa (Cocktail Inhibidor de Proteasa Complete<sup>TM</sup>) de Boehringer

Mannheim (Indianapolis, IN). El kit de sustrato Immun Star HRP fue obtenido de Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA).

## 6.4. Experimentos celulares in vitro

Las células THP-1, una línea celular monocítica de leucemia humana ampliamente utilizada para estudiar las funciones de monocitos/macrófagos, se cultivaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina, una solución antibiótica/antimicótica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) Y suero bovino fetal al 10%. Las células THP-1 se incubaron durante 24 horas con medios que contenían suero de ratones bajo dietas SD, HSD, HFD y HSFD.

## 6.5. Niveles de IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$

Los niveles séricos o medios de cultivo de IL-1 $\beta$  (GenWay, San Diego CA, EE. UU.) Y TNF- $\alpha$  (Biosource, Reino Unido y GenWay, San Diego, EE. UU.) se analizaron por duplicado utilizando kits ELISA comerciales.

## 6.6. Leptina y adiponectina

Los niveles séricos de leptina y adiponectina se analizaron por duplicado utilizando kits ELISA comerciales (R & D Systems, Minneapolis, EE. UU.).



## 6.7. Biomarcadores séricos

Los niveles séricos de glucosa, triglicéridos, colesterol, ácido úrico, aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y creatina quinasa se analizaron usando kits comerciales (Randox Laboratories, Antrim, Reino Unido).

## 6.8. Inmunotransferencia

Se realizó Western Blot con métodos estándar. Después de la transferencia de proteínas, la membrana se incubó con diversos anticuerpos primarios diluidos 1:1000, y luego con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano a una dilución 1:10000. Los complejos de proteínas específicas se identificaron utilizando el kit de sustrato Immun Star HRP (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.).

## 6.9. Peroxidación lipídica

El ensayo FOX se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito anteriormente (Jiang, Hunt & Wolff, 1992). El reactivo FOX se preparó mezclando en orden: 90 ml de metanol, 88 mg de BHT, 10 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 mM, 9,8 mg de hexahidrato de sulfato ferroso de amonio y 7,6 mg de naranja de xilenol. Se añadieron 680 µl de reactivo FOX a 320 µl de cada muestra, y la solución se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación suave. Después de una centrifugación corta a alta velocidad (3.000 xg durante 1 minuto a temperatura ambiente), se leyó la absorbancia de las muestras a 560 nm frente al blanco (NaCl al 0,9% y reactivo FOX). Para la cuantificación de hidroperóxidos, se usó una dilución en serie estándar de peróxido de hidrógeno.

## 6.10. Proteínas carboniladas

Los carbonilos de proteínas se analizaron por duplicado mediante kits de ELISA comerciales usando un kit comercial de Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, EE. UU.).

## 6.11. Estudio histológico

Tras anestesiar a los ratones, se extirparon los corazones y se colocaron inmediatamente en formalina tamponada neutra al 10% a temperatura ambiente durante 24 horas tras un breve enjuague con PBS. Las muestras fueron sumergidas posteriormente en parafina, se cortaron en secciones de 5  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las áreas de sección transversal de cardiomiocitos se calcularon en un microscopio digital ( $\times 400$ ) con el software ImageJ (versión 1.34S). Se utilizó una tinción con tricrómico de Masson para detectar la brosis

en las secciones del corazón y se calcularon las áreas bróticas también en un microscopio digital ( $\times 400$ ) con el programa ImageJ (versión 1.34S).

## 6.12. PCR cuantitativa en tiempo real

La expresión del gen NLRP3 fue analizada mediante PCR cuantitativa con SYBR Green de ARNm extraído de tejidos cardíacos. El ARN celular total se purificó de las células usando el método Trisure (Bioline, Londres, Reino Unido). La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente. Se eliminó el ADN genómico contaminante mediante la incubación de un microgramo de ARN total de cada muestra con tampón de eliminación de gDNA (Quantitect Reverse Transcription Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) durante 5 min a 42 °C. Las muestras de ARN se retrotranscribieron posteriormente a ADNc usando el kit de transcripción inversa QuantiTect (Qiagen, Hilden, Alemania). Las condiciones de ciclo térmico utilizadas fueron desnaturalización a 95 °C durante 20 s, 40 ciclos de cebado a 54°C

durante 20 s, y elongación a 72 °C durante 20 s. Los cebadores utilizados pueden consultarse en la **Tabla 1**. Todas las reacciones fueron realizadas por duplicado. Se añadieron mezclas de reacción, sin ARN, que se usaron como controles negativos en cada ejecución. Se confirmó la ausencia de contaminación del ADN genómico mediante el establecimiento de reacciones de control que no contienen transcriptasa inversa. Los cambios en la expresión de genes diana fueron calculados mediante el método  $\Delta\Delta C_t$ .

**Tabla 1:** Cebadores del estudio de expresión génica.

Gen amplificado	Secuencia
VCAM-1	Primer forward: TTATTGTTGACATCTCCCCCG Primer reverse: TCATTCCTTACCACCCCATTG
ICAM-1	Primer forward: AACTTTTCAGCTCCGGTCCTG Primer reverse: TCAGTGTGAATTGGACCTGCG
MMP2	Primer forward: CAAGGACCGGTTTATTTGGC Primer reverse: ATTCCCTGCGAAGAACACAG
Fibronectina	Primer forward: GCAGTGACCAACATTGATCGC Primer reverse: AAAAGCTCCCGGATTCCATCC
Caspasa 3	Primer forward: TGGACTGTGGCATTGAGACAG Primer reverse: CGACCCGTCCTTTGAATTC
COX-2	Primer forward: GTGTATCCCCCACAGTCAAA Primer reverse: AACTCTGTTGTGCTCCCGAA
TNF- $\alpha$	Primer forward: CTCAACTGGTGTGCGAGAAGTCC Primer reverse: TTCCTTGAGCGTGCTGAACAGC
IL-6	Primer forward: AGACAGCCACTCACCTCTTCAG Primer reverse: TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
NLRP3	Primer forward: GGAGAGACCTTTATGAGAAAGCAA Primer reverse: GCTGTCTTCCTGGCATATCACA
IL-1 $\beta$	Primer forward: TTACAGTGGCAATGAGGATGAC Primer reverse: GTCGGAGATTCTGCTAGCTGGAT

## 6.13. Estadísticas

Todos los datos se expresan como medias  $\pm$  SEM. Después de la evaluación de la normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk, se midieron las diferencias estadísticas entre los diferentes grupos utilizando una prueba de t de Student independiente o un análisis de varianza de 1 vía (ANOVA) cuando fue apropiado con la prueba de Tukey post hoc. Un valor P de  $\leq 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software Prism versión 5.0a (GraphPad, San Diego, CA). Los asteriscos en las figuras representan lo siguiente: \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0,01$ ; y \*\*\*:  $P \leq 0,001$ .

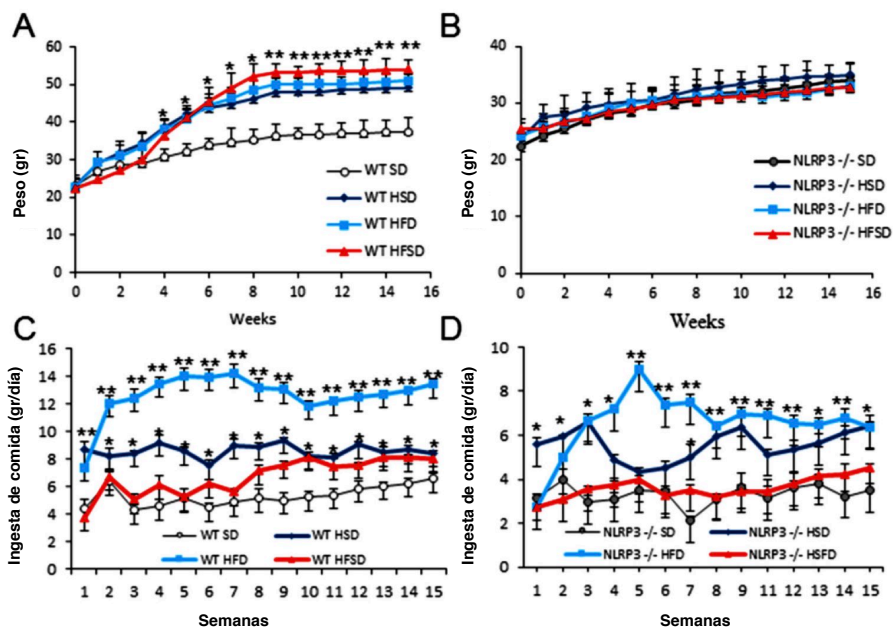
## 7. Resultados

### 7.1. La ausencia de NLRP3 protege de obesidad inducida mediante HSD, HFD y HSFD

Hemos investigado el papel del NLRP3-inflamasoma en ratones que carecen del gen NLRP3 y expuestos a las diferentes dietas que inducen la obesidad. La ingesta de alimentos y la evolución del peso corporal se examinaron semanalmente durante 15 semanas en cada grupo. Se ha demostrado que las diferentes dietas inducen un aumento de peso significativo en ratones WT (**Figura 6 A y B**) (Stienstra, van Diepen, Tack, *et al.*, 2011) a pesar del aumento en el consumo de alimentos que fue similar en todos los grupos de ratones WT y NLRP3<sup>-/-</sup> (**Figura 6 C y D**). Como era de esperar, los corazones de los ratones WT eran sustancialmente más pesados que los alimentados con SD al final del estudio ( $p < 0,05$ ) (**Figura 7 A y Figura 8**). Este



hallazgo no se alteró en el genotipo NLRP3<sup>-/-</sup> en ninguna dieta asociada a la obesidad.

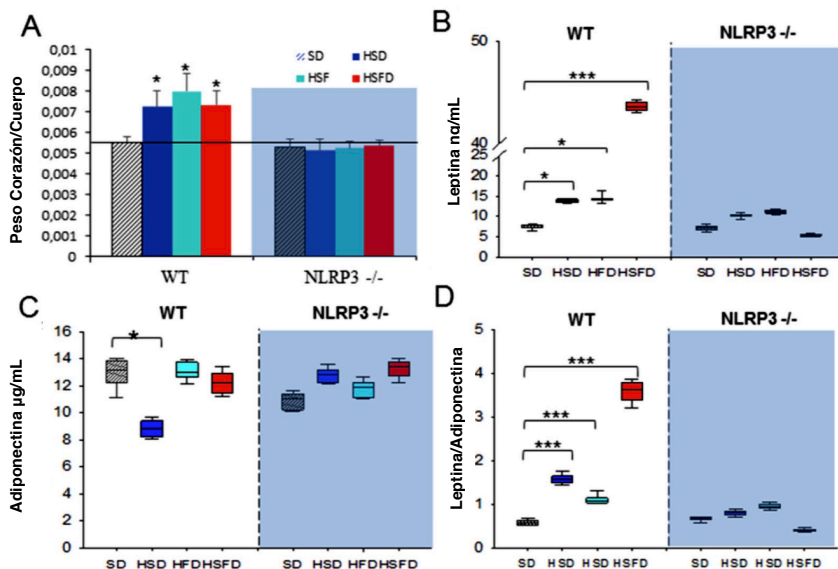


**Figura 6. La supresión de señalización *Nlrp3* previene los efectos inducidos por la obesidad de las dietas HSD, HFD y HSFD.**

(A y B) Tabla de peso corporal de la obesidad inducida por dietas en ratones WT y *NLRP3*<sup>-/-</sup>. Los ratones fueron alimentados con las dietas durante 15 semanas y sus pesos corporales fueron monitorizados semanalmente.

*(C y D) Promedio diario de ingesta de alimentos oral normalizado al peso corporal, medido según las diferentes dietas. La ingesta de alimento de los ratones se midió semanalmente. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM, n = 10 ratones; \* P <0.05, \*\* P <0.005, \*\*\* P <0.001.*

En los seres humanos, las dietas altas en calorías causan numerosas alteraciones que incluyen aumento de la glucosa, niveles de colesterol y desregulación de leptina/adiponectina que conduce a enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico y enfermedad de hígado graso no alcohólico (Baur, Pearson, Price, *et al.*, 2006; DiNicolantonio, Lucan & O’Keefe, 2016). Los ratones HSD, HFD y HSFD alimentados con WT mostraron un aumento de los niveles séricos de leptina (HSD y HFD,  $p < 0,05$ ; HSFD,  $p < 0,001$ ) y la relación leptina/adiponectina ( $p < 0,001$ ) (**Figura 7 B-D**), incluida la anormal niveles séricos de glucosa, colesterol, triglicéridos, transaminasas hepáticas, ácido úrico y creatinina (**Tabla 2**). Estos cambios no se observaron en ratones NLRP3<sup>-/-</sup>.



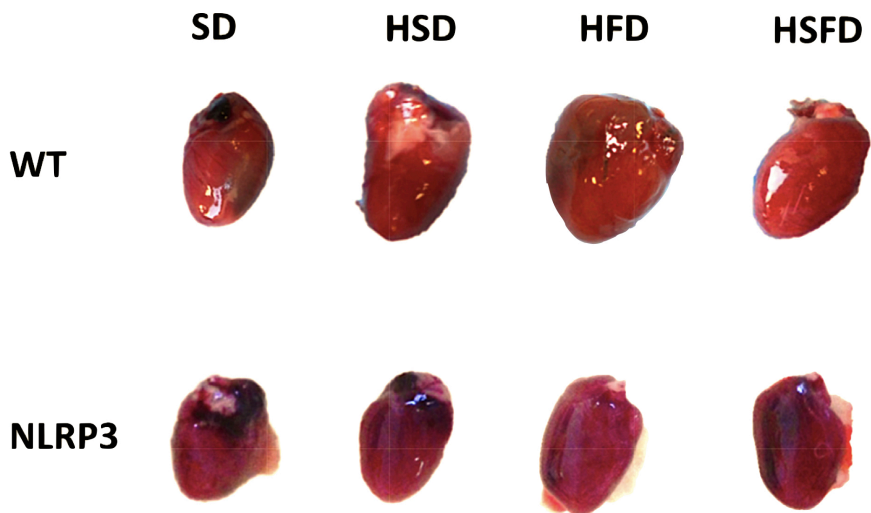
**Figura 7. La supresión de señalización NLRP3 previene los efectos inducidos por la obesidad de las dietas HSD, HFD y HSFD (continuación).**

**(A)** Peso del corazón normalizado al peso corporal.

**(B-D)** Niveles de leptina, adiponectina y proporción en plasma. Se tomaron muestras de sangre después del ayuno durante la noche. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM,  $n = 10$  ratones; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Tabla 2:** Efectos de las dietas en ratones de tipo silvestre y NLRP3-/- en varios biomarcadores en plasma. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. UL, unidades por litro. \* P <0.05 versus dieta estándar. † P <0.05 versus la misma dieta entre WT y NLRP3. (n = 10)

Parámetros	Wild-type				NLRP3			
	SD	HSD	HFD	HSFD	SD	HSD	HFD	HSFD
Colesterol (mg/dL)	304.9 (10.5)	267.7 (16.7)	364.5 (10.9)*	395 (12.3)*	285.2 (8.4)	263 (9.2)	300.1 (10.8)†	323.2 (11.4)†
Triglicéridos (mg/dL)	37.84 (7.3)	32.29 (6.3)	34.02 (7.1)	31.94 (5.2)	48.61 (10.3)	70.13 (11.1)	66.66 (12.3)	29.38 (8.8)
Glucosa (mg/dL)	151.4 (10.5)	195.4 (11.3)*	172.9 (10.6)	183.9 (10.8)*	117.5 (12.4)†	126.3 (10.1)†	104 (9.6)†	109.6 (9.4)†
Albúmina (mg/dL)	2.31 (0.12)	2.02 (0.11)	3.11 (0.11)*	1.72 (0.14)	1.93 (0.10)	2.08 (0.12)	2.05 (0.13)	2.04 (0.14)
Bilirrubina (mg/dL)	0.16 (0.01)	0.14 (0.02)	0.17 (0.03)	0.15 (0.02)	0.18 (0.03)	0.15 (0.02)	0.19 (0.03)	0.18 (0.02)
Ala aminotransferasa (UL)	320.8 (97)	670.83 (105)*	637.16 (115)*	414.16 (98)*	344.15 (91)	402.5 (99)†	431.66 (113)†	309.13 (110)†
Asp aminotransferasa (UL)	321.1 (101)	576.3 (61)*	598.5 (75)*	364.8 (99)	291.3 (91)	269.5 (101)†	333.3 (112)†	350 (101)
Lactato deshidrogenasa (UL)	1480 (215)	1121 (283)	4599 (393)*	2667 (205)*	1325 (198)	915 (101)†	1218 (196)†	1106 (151)†
Creatina fosfoquinasa (UL)	3436 (723)	4815 (675)	5714 (745)*	6063 (697)*	3547 (845)	3857 (431)	4222 (250)†	4785 (640)†
Ácido Úrico ( $\mu$ Mol/dL)	24.24 (2.3)	28.29 (1.3)*	32.33 (2.1)*	41.08 (1.9)	23.25 (1.5)	24.92 (2.1)	26.94 (1.9)†	25.59 (1.8)†
Creatinina (mg/dL)	0.64 (0.01)	2.73 (0.51)*	1.92 (0.43)*	0.96 (0.03)*	0.80 (0.05)	1.24 (0.23)†	1.12 (0.28)	0.96 (0.04)



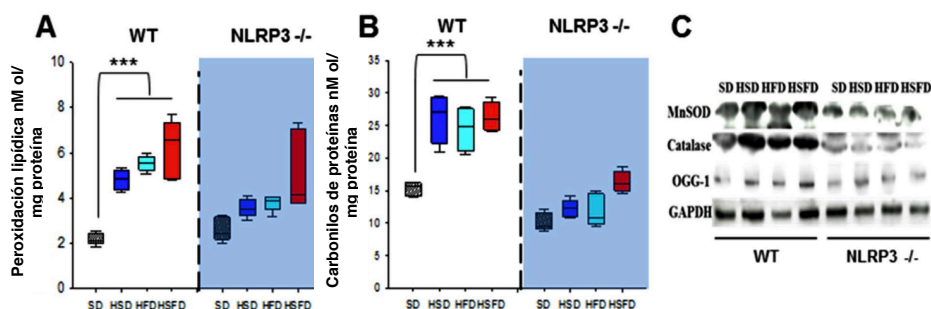
**Figura 8.** Imágenes representativas del corazón de ratones WT y *NLRP3*<sup>-/-</sup> alimentados con dieta estándar y dieta alta en azúcar (HSD), dieta alta en grasas (HFD) y dieta rica en grasas de azúcar (HSFD).

## 7.2. La deficiencia de NLRP3 induce una protección moderada contra el estrés oxidativo en el corazón y la inflamación

El estrés oxidativo tiene un papel esencial en la activación de inflamasomas (Abderrazak, Syrovets, Couchie, *et al.*, 2015), y ha sido implicado en la fisiopatología cardíaca inducida por dietas obesogénicas (Ballal, Wilson, Harmancey, *et al.*, 2010). En consecuencia, el análisis de biomarcadores de estrés oxidativo en corazones de HSD, HFD y HSFD alimentados ratones WT reveló un aumento significativo en la peroxidación lipídica (**Figura 9 A**), carbonilos de proteína (**Figura 9 B**) y de 8-oxoguanina glycosylasa (OGG1) (**Figura 9 C** y **Figura 10 A**). En comparación con los ratones WT, los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> tenían una tendencia hacia una peroxidación lipídica y niveles de OGG-1 elevados (**Figura 9 A-C** **Figura 10 A**). Este hallazgo fue consistente con los biomarcadores antioxidantes que no se incrementaron en estos animales knockout alimentados con die-



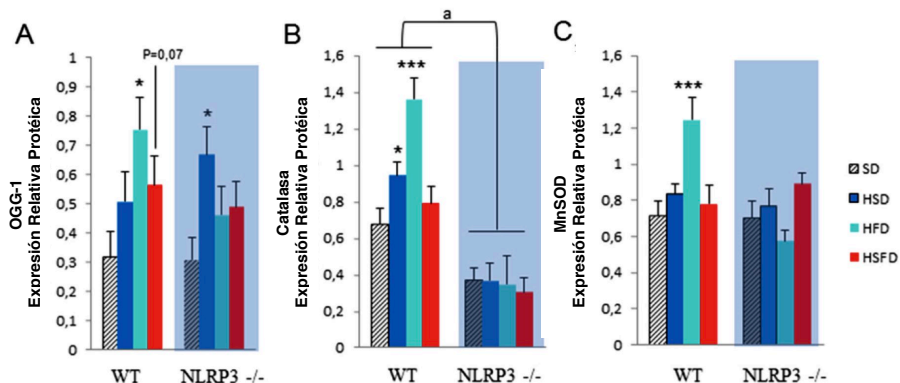
tas obesogénicas, lo que sugiere, quizás, la ausencia de mecanismos de defensa compensatoria (**Figura 10 B y C**) en este genotipo. Estos resultados también se complementaron acompañados por biomarcadores inflamatorios séricos elevados tales como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en ratones WT (**Figura 11 A y B**). Curiosamente, no se observaron diferencias en los niveles séricos de IL-1 $\beta$  y un aumento moderado en el TNF- $\alpha$  en todos los grupos NLRP3<sup>-/-</sup> (**Figura 11 A y B**).



**Figura 9. La eliminación de la señalización de *Nlrp3* protege contra los efectos oxidativos e inflamatorios de las dietas HSD, HFD y HSFD.**

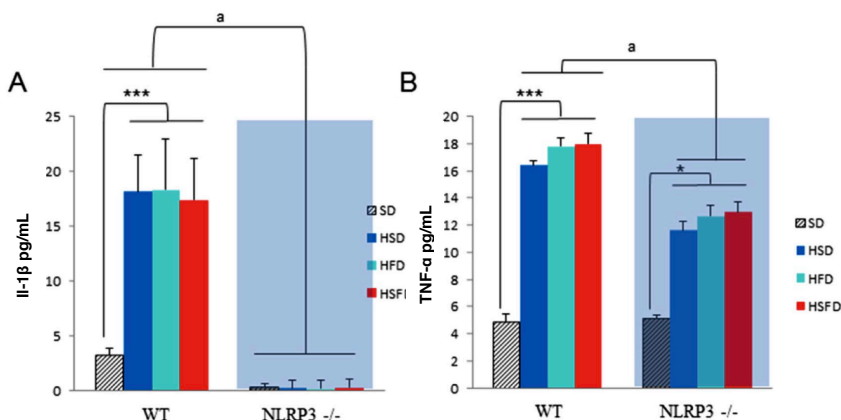
(**A** y **B**) Niveles de peroxidación lipídica y carbonilos de proteínas en tejidos cardíacos de ratones.

(**C**) Nivel de expresión de proteína de 8-oxoguanina glycosylasa (OGG-1), MnSOD y catalasa. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM con una transferencia representativa,  $n = 10$  ratones; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  HSD, HFD y HSFD vs SD; <sup>a</sup> $P < 0.005$  WT vs NLRP3<sup>-/-</sup>.



**Figura 10. La eliminación de la señalización de *Nlrp3* protege contra los efectos oxidativos y inflamatorios de las dietas HSD, HFD y HSFD (continuación I).**

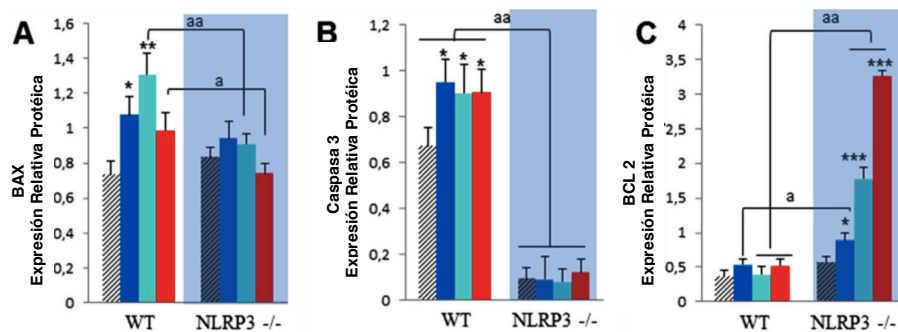
(A-C) Cálculo densitométrico de los niveles de expresión proteica de transferencias Western en tejidos cardíacos de ratones en relación con GAPDH (control de carga). Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM con una transferencia representativa,  $n = 10$  ratones; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  HSD, HFD y HSFD vs SD; <sup>a</sup> $P < 0.005$  WT vs NLRP3<sup>-/-</sup>.



**Figura 11. La eliminación de la señalización de *Nlrp3* protege contra los efectos oxidativos y inflamatorios de las dietas HSD, HFD y HSFD (continuación II).**

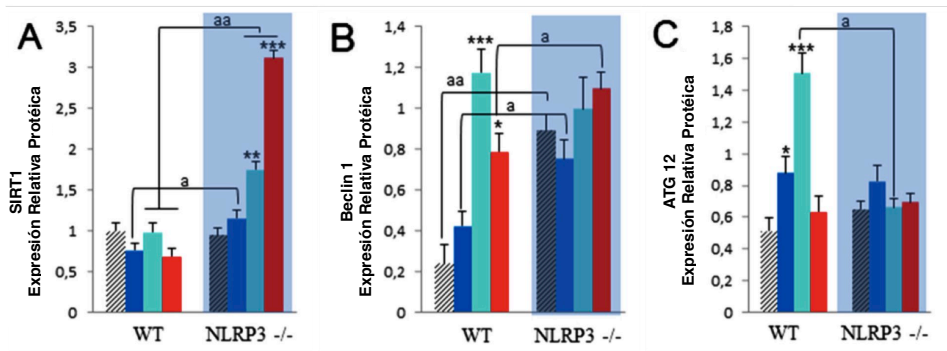
**(A y B)** Los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en suero de ratones WT y NLRP3<sup>-/-</sup> alimentados con las diferentes dietas se determinaron mediante ELISA. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM con una transferencia representativa,  $n = 10$  ratones; \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  HSD, HFD y HSFD vs SD; <sup>a</sup> $P < 0.005$  WT vs NLRP3<sup>-/-</sup>.

Debido a que la dieta alta en grasas también está asociada a la apoptosis de los cardiomiocitos, que se combina con el estrés oxidativo y la desregulación de la inflamación (Hsu, Chen, Lee, *et al.*, 2016), determinamos varios biomarcadores apoptóticos. Aquí la alimentación con HSD, HFD y HSFD produjo un aumento significativo en la expresión de proteínas de BAX cardíaco y caspasa 3 activa (**Figura 9 A, B** y **Figura 11 A**) acompañadas por niveles reducidos de expresión cardíaca de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (**Figura 9 C** y **Figura 11 A**) en WT ratones. Los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> mostraron contenidos reducidos de marcadores relacionados con la apoptosis, consistentes con la acumulación de Bcl-2 que estimula la actividad antiapoptótica en el corazón (**Figura 9 C** y **Figura 11 A**). Curiosamente, estas observaciones también fueron acompañadas por el aumento de los niveles de expresión de proteína SIRT1 en ratones knockout (**Figura 10 A** y **Figura 11 A**) que tiene un papel en la protección del corazón, por ejemplo, por los efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Hsu, Chen, Lee, *et al.*, 2016).



**Figura 12. Cambios en la apoptosis y la autofagia en respuesta a las dietas HSD, HFD y HSFD en ratones WT y NLRP3<sup>-/-</sup>.**

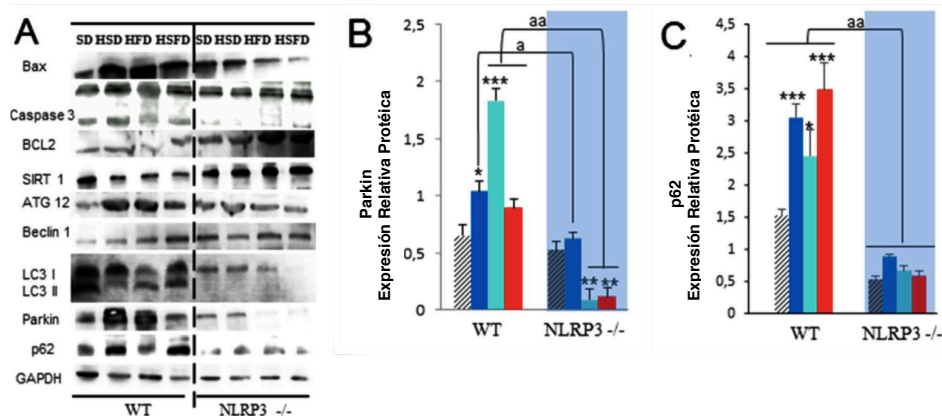
(A-C) Cuantificación densitométrica de los niveles de expresión proteica de Bax, caspasa 3 y Bcl - 2 en tejidos cardíacos de ratones con respecto a GAPDH (control de carga). Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$  ratones; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$  HSD, HFD y HSFD vs SD; <sup>a</sup> $P < 0.005$  WT frente a NLRP3<sup>-/-</sup>.



**Figura 13. Cambios en la apoptosis y la autofagia en respuesta a las dietas HSD, HFD y HSFD en ratones WT y NLRP3<sup>-/-</sup>.**

**(A)** Cuantificación densitométrica de los niveles de expresión proteica de Sirt1 en el corazón de ratones.

**(B y C)** Cuantificación densitométrica de los niveles de expresión proteica de los marcadores de autofagia en el corazón. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$  ratones; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$  HSD, HFD y HSFD vs SD; <sup>a</sup> $P < 0.005$  WT frente a NLRP3<sup>-/-</sup>.



**Figura 14. Cambios en la apoptosis y la autofagia en respuesta a las dietas HSD, HFD y HSFD en ratones WT y NLRP3<sup>-/-</sup>.**

(G) Análisis Western Blot con transferencia representativa que incluye LC3.

(H e I) Niveles de expresión de Parkin y nivel de p62 en los corazones de ratones WT y NLRP3<sup>-/-</sup>. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$  ratones; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$  HSD, HFD y HSFD vs SD; <sup>a</sup> $P < 0.005$  WT frente a NLRP3<sup>-/-</sup>.



### 7.3. Los ratones con inhibición del NLRP3 muestran una protección autofágica contra el daño cardíaco inducido por HSD, HFD y HSFD

Uno de los mecanismos más importantes en la protección/lesión cardíaca es la autofagia, que se ve afectada durante el envejecimiento y la obesidad inducida por la dieta, produciendo un proceso de depuración menos efectivo y contribuyendo a un importante daño cardíaco (Linton, Gurney, Sengstock, *et al.*, 2015). HSD, HFD y HSFD indujeron altas expresiones de dos proteínas autofágicas importantes tales como Beclin 1 y ATG-12 (**Figura 10 B, C y Figura 11 A**) en animales WT. Además, se observó un flujo autofágico deteriorado, determinado por la expresión de LC3-II y una expresión aumentada de proteínas implicadas en las vías de eliminación tales como PARKIN y p62/SQSTM1 (**Figura 11 A, B y C**). De manera interesante, todos los grupos NLRP3<sup>-/-</sup> mostraron una maquinaria autofágica incrementada y más eficiente (**Figura 10 B-C y Figura 11 A-C**). Como

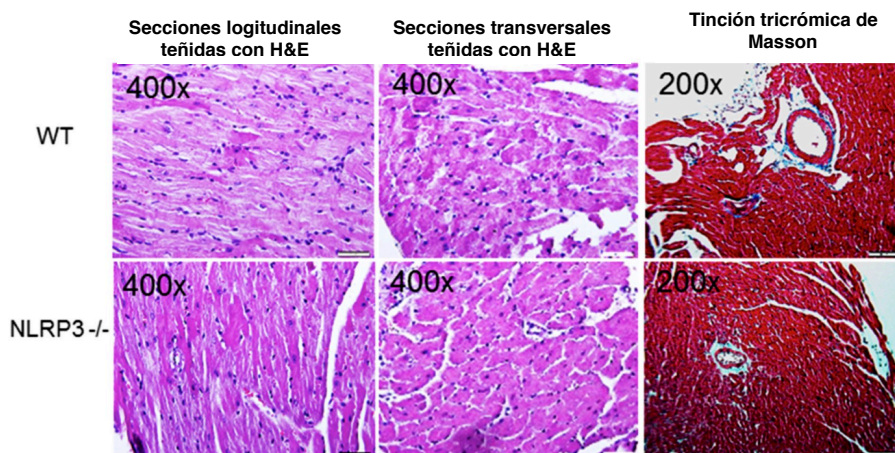
la sobreexpresión de LC3-II puede provocar un incremento de la autofagia o un deterioro del flujo autofágico, estos cambios de LC3-II deben interpretarse junto con los niveles de p62/SQSTM1 y teniendo en cuenta que la LC3-II misma está sujeta a degradación autofágica en el lisosoma (Klionsky, Abdelmohsen, Abe, *et al.*, 2016). Los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> mostraron una inducción de autofagia más eficiente, como sugieren los niveles más bajos de LC3-II (**Figura 11 A**) y los niveles reducidos de proteínas tales como parkina (**Figura 11 B**) y p62/SQSTM1 (**Figura 11 C**).

## 7.4. Cambios en la expresión génica de moléculas de adhesión y marcadores de fibrosis en el corazón

Para evaluar el impacto de las dietas sobre la histología del miocardio, se examinó el área de la sección transversal de

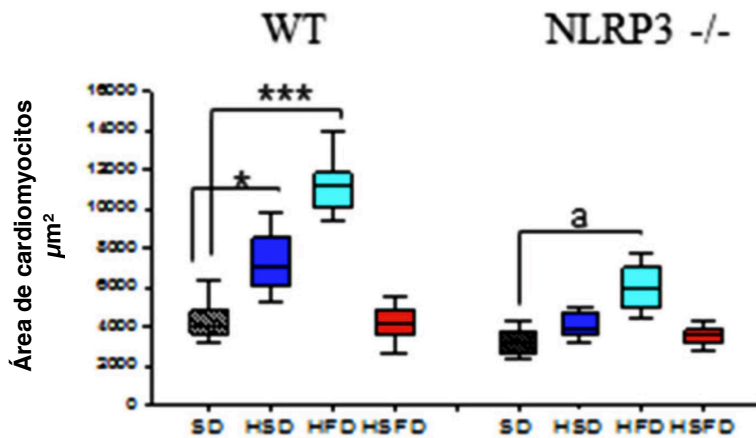
los cardiomiocitos y la fibrosis. En las secciones teñidas con hematoxilina y eosina, HSD y HFD pero no HSFD mostraron un desarreglo de las miofibrillas y un aumento en el área de sección transversal de los cardiomiocitos. Sin embargo, los grupos NLRP3<sup>-/-</sup> sólo mostraron un aumento moderado en HFD (**Figura 15**, **Figura 16** y **Figura 17**). El examen adicional con tinción con tricrómico de Masson reveló una fibrosis perivascular manifiesta en el grupo de WT sin cambios significativos en el grupo NLRP3<sup>-/-</sup> (**Figura 15** y **Figura 17**). También estudiamos los cambios en la expresión génica de varios biomarcadores de activación endotelial y fibrosis. La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) se incrementaron en los tejidos cardíacos de HSD, HFD y HSFD alimentados con animales, pero no se observaron cambios significativos en NLRP3<sup>-/-</sup> animales expuestos a la mismas dietas (**Figura 18**). De forma similar, los biomarcadores de fibrosis típicos tales como Matrix metalopeptidasa 2 (MMP2) y fibronectina también se incrementaron en tejidos cardíacos de HSD, HFD y animales WT alimentados con HSFD, pero nuevamente,

no se observaron cambios notables en ratones NLRP3 -/- (**Figura 18**). En la misma línea, la apoptosis biomarcador caspasa 3 y el biomarcador inflamatorio endotelial COX-2 también se incrementaron en tejidos cardíacos de HSD, HFD y animales alimentados con HSFD, pero de nuevo, no se observaron cambios significativos en animales knockout (**Figura 18**).



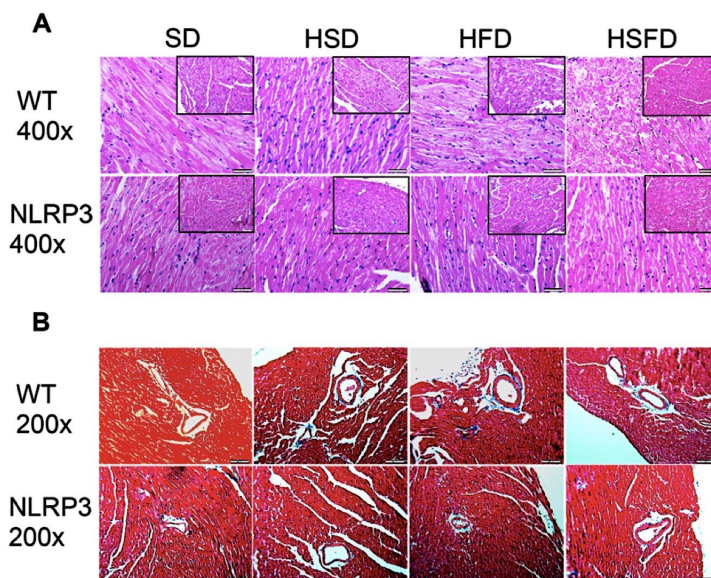
**Figura 15. Análisis histológicos y cambios en la expresión génica de moléculas de adhesión y marcadores de la brosis en el corazón.**

Micrografías representativas de hematoxilina-eosina que muestran secciones transversales del miocardio ventricular izquierdo (VI), área de sección transversal y micrografías representadas con tinción tricrómica de Masson que muestran secciones perivasculares de miocardio de HFD de WT y NLRP3<sup>-/-</sup>. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$  ratones; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$  HSD, HFD y HSFD vs SD.



**Figura 16. Análisis histológicos y cambios en la expresión génica de moléculas de adhesión y marcadores de la brosis en el corazón.**

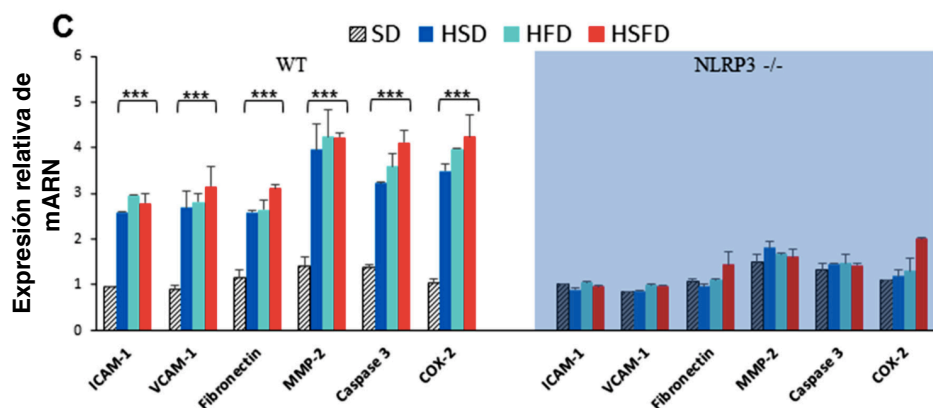
*Análisis cuantitativo del área transversal de los cardiomiocitos (transversal) con mediciones de  $\approx 100$  cardiomiocitos de 3 a 6 ratones por grupo. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$  ratones; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$  HSD, HFD y HSFD vs SD.*



**Figura 17. Análisis histológicos.**

**(A)** Micrografías representativas de hematoxilina y eosina que muestran secciones transversales del miocardio ventricular izquierdo (VI). Los recuadros superiores derechos muestran un área representativa de sección transversal

**(B)** Micrografías representativas tricrómicas de Masson que muestran secciones perivasculares del miocardio.



**Figura 18. Análisis histológicos y cambios en la expresión génica de moléculas de adhesión y marcadores de la brosis en el corazón.**

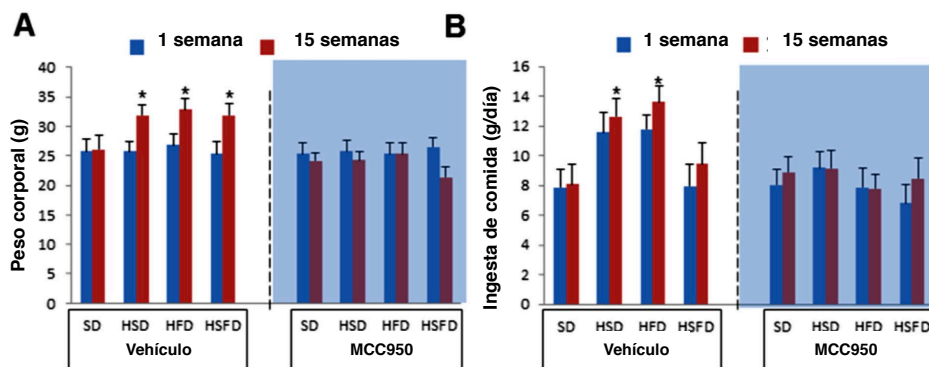
Expresiones relativas de genes de ICAM-1 y VCAM-1 (media  $\pm$  SEM) determinadas por PCR cuantitativa en corazón de WT y NLRP3<sup>-/-</sup>. Expresiones relativas de genes de MMP-2, bronectyn y expresiones génicas relativas de Caspase 3 y COX-2 determinadas por PCR cuantitativa en corazón de WT y NLRP3<sup>-/-</sup>. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM,  $n = 6-8$  ratones; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$ , \*\*\*  $P < 0.001$  HSD, HFD y HSFD vs SD.



## 7.5. La inhibición farmacológica de NLRP3 previene la obesidad y el daño cardíaco inducidos por HSD, HFD y HSFD

Usando una aproximación farmacológica, hemos probado el efecto de las mismas dietas tras la inhibición de NLRP3 con MCC950. Los grupos de WT para este experimento se distribuyeron en vehículos y en diferentes animales de dieta + MCC950 (20 mg/kg/día i.p.). Después de quince semanas, todas las dietas obesogénicas condujeron a un mayor peso en el grupo vehículo (**Figura 18 A**), sin embargo, la inhibición farmacológica de NLRP3-protegió a estos animales de la obesidad (**Figura 18 A**), similar a la delección genética de NLRP3. La ingesta diaria de alimentos fue menor en los grupos tratados con MCC950 en comparación con los grupos de vehículos, pero, curiosamente, con cambios relativos comparables entre las diferentes dietas (**Figura 18 B**). Se demostró que las diferentes dietas aumentan el peso del corazón en grupos de vehículos (**Fi-**

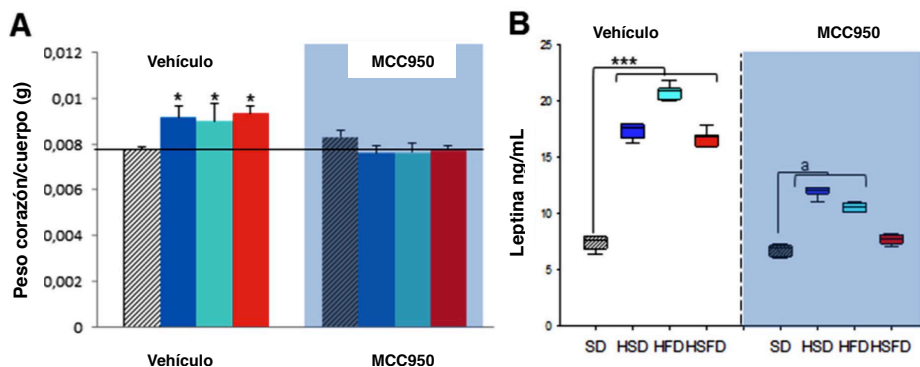
**gura 19 A y Figura 20**), sin cambios después de la administración de MCC950. Además, MCC950 redujo el área de los cardiomiocitos y la fibrosis perivascular inducida por las dietas (**Figura 21**).



**Figura 19.** La inhibición de NLRP3 por MCC950 previene los efectos inducidos por la obesidad de las dietas HSD, HFD y HSFD.

(A) Tabla de peso corporal de la obesidad inducida por dietas en ratones WT-vehicle y MCC950 alimentados con dietas HSD, HFD y HSFD. Los ratones fueron alimentados con las dietas durante 15 semanas y sus pesos corporales fueron monitoreados semanalmente. Representamos los cambios de la última semana con respecto a la primera semana.

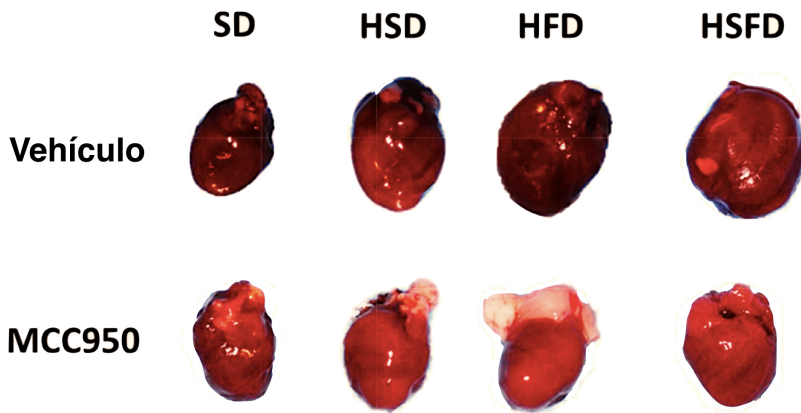
*(B) Promedio diario de ingesta de alimentos oral normalizado al peso corporal, medido según las diferentes dietas. La ingesta de alimento de los ratones se midió semanalmente. Representamos los cambios de la última semana con respecto a la primera semana. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM, n=10 ratones; \*P<0.05, \*\*\*P<0.005 HSD, HFD y HSFD vs SD; <sup>a</sup>P<0,05, <sup>aa</sup>P<0,005 MCC950 frente a vehículo.*



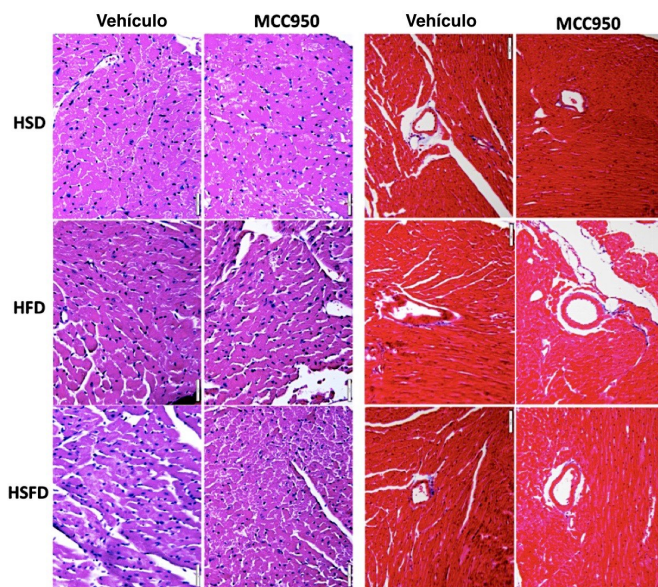
**Figura 20.** La inhibición de NLRP3 por MCC950 previene los efectos inducidos por la obesidad de las dietas HSD, HFD y HSFD.

**(A)** Peso cardíaco normalizado al peso corporal.

**(B)** Niveles de leptina. Se tomaron muestras de sangre después del ayuno durante la noche. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM,  $n=10$  ratones;  $*P<0.05$ ,  $***P<0.005$  HSD, HFD y HSFD vs SD;  $^aP<0,05$ ,  $^{aa}P<0,005$  MCC950 frente a vehículo.

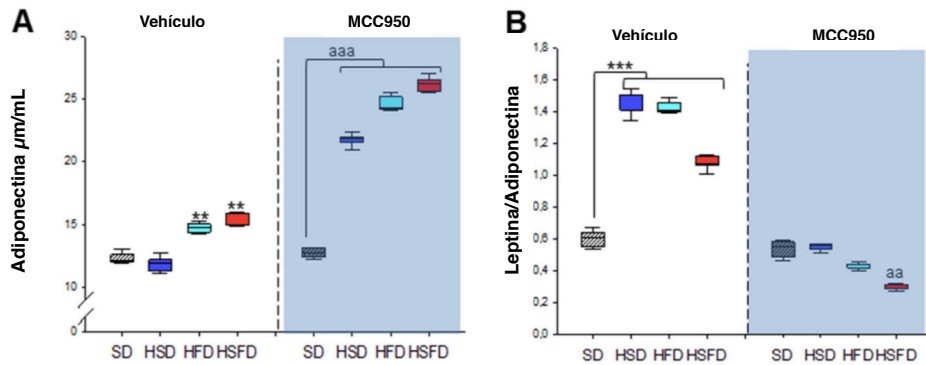


**Figura 21.** Imágenes representativas del corazón de ratones alimentados con dieta estándar y dieta alta en azúcar (HSD), dieta alta en grasas (HFD) y dieta alta en azúcar y grasas (HSFD) y tratados con vehículo o el inhibidor de NLRP3 MCC950.



**Figura 22. Análisis histológicos.**

*Micrografías representativas de tinción con hematoxilina y eosina que muestran secciones transversales del miocardio ventricular izquierdo (VI) y micrografías representadas con tinción tricrómica de Masson que muestran secciones perivasculares del miocardio.*



**Figura 23.** La inhibición de NLRP3 por MCC950 previene los efectos inducidos por la obesidad de las dietas HSD, HFD y HSFD.

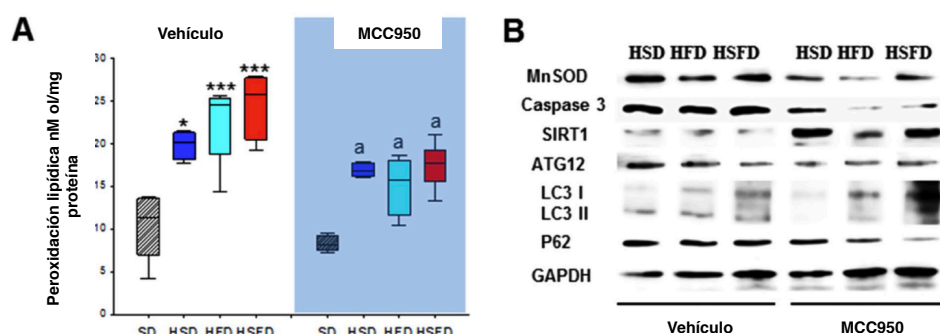
**(A-B)** Niveles de adiponectina y relación leptina/adiponectina en plasma. Se tomaron muestras de sangre después del ayuno durante la noche. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM,  $n=10$  ratones; \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.005$  HSD, HFD y HSFD vs SD; <sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>aa</sup> $P<0.005$  MCC950 frente a vehículo.



Los estudios metabólicos realizados en estos grupos de animales mostraron cómo el tratamiento con el inhibidor MCC950 mejoró el efecto sobre varios metabolitos circulantes. Por lo tanto, la proporción aumentada de leptina y leptina/adiponectina observada después de la alimentación HSD, HFD y HSFD en grupos de vehículos, se redujo en los grupos tratados con MCC950 con niveles elevados de adiponectina (**Figura 20 B** y **Figura 23 A y B**). De forma similar, algunas alteraciones de los niveles de biomarcadores en el suero que incluyen glucosa, colesterol, triglicéridos, transaminasas hepáticas, ácido úrico y creatinina (**Tabla 3**) se revirtieron en los ratones tratados con MCC950.

Guiándonos por estos hallazgos en varias rutas metabólicas, examinamos el efecto de las dietas obesogénicas en el estrés oxidativo, la apoptosis y la autofagia en los tejidos del corazón y en comparación con las observaciones descritas con ratones NLRP3<sup>-/-</sup>. Como se esperaba, se observó que el inhibidor dio como resultado una reducción significativa de la pero-

oxidación de lípidos en comparación con los grupos HSD, HFD y HSFD-vehículo junto con una reducción de la expresión de proteína MnSOD (**Figura 23 A-B** y **Figura 24 A**). Además, MCC950 también indujo la regulación negativa de la proteína apoptótica de la caspasa 3 activa (**Figura 23 B** y **Figura 24 B**).



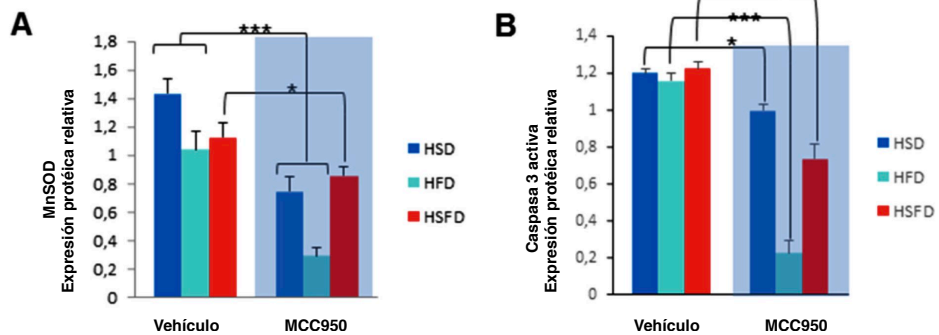
**Figura 24. Cambios en el estrés oxidativo, la apoptosis y la autofagia en respuesta a MCC950.**

**(A)** Peroxidación lipídica.

**(B)** Niveles de expresión proteica por western blot de antioxidantes MnSOD en corazón después del tratamiento con MCC950 en ratones. Comparamos las dietas HSD, HFD y HSFD con grupos tratados con MCC950. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM con una transferencia representativa,  $n=4-5$  ratones;  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$  MCC950 vs vehículo.

**Tabla 3:** Efectos de las dietas y MCC950 en diversos biomarcadores en suero. Los valores se presentan como media  $\pm$  SEM. UL, unidades por litro. \* P <0.05 versus dieta estándar. † P <0.05 versus la misma dieta entre vehículo y MCC950. (n = 8)

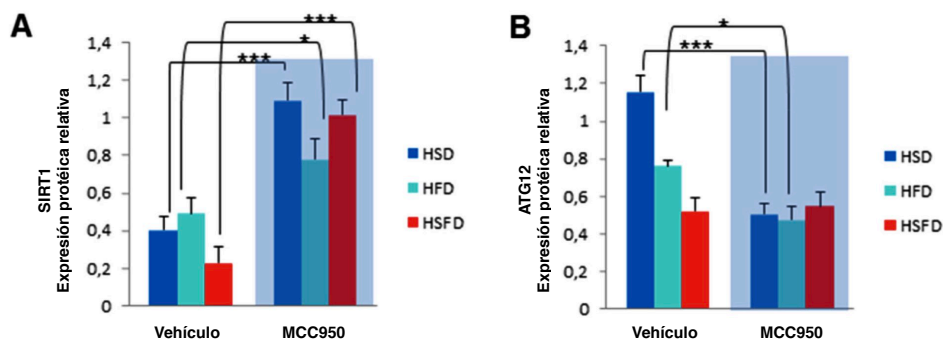
Parámetros	Vehículo				MCC950			
	SD	HSD	HFD	HSFD	SD	HSD	HFD	HSFD
Colesterol (mg/dL)	330.7 (18.5)	278 (13.2)	570.4 (25.1)*	430 (22)*	318.2 (6.9)	310 (10.1)†	370 (15.1)†	340 (15)†
Triglicéridos (mg/dL)	38.2 (6.4)	43.1 (5.4)	33.5 (5.9)	38.1 (6.8)	35.6 (7.2)	37.9 (8.8)	25.9 (6.3)	28.9 (8.1)
Glucosa (mg/dL)	158.1 (11.2)	203 (13.1)*	192.1 (10.1)*	195.2 (11)*	149.1 (10.6)	169.2 (11.3)†	128.8 (8.2)†	130.5 (13.6)†
Albúmina (mg/dL)	2.8 (0.15)	2.7 (0.13)	3.9 (0.19)*	2.3 (0.18)	2.7 (0.13)	3 (0.11)	1.5 (0.15)†	2.9 (0.10)
Bilirrubina (mg/dL)	0.17 (0.02)	0.16 (0.02)	0.16 (0.04)	0.14 (0.08)	0.16 (0.04)	0.17 (0.03)	0.17 (0.06)	0.17 (0.05)
Ala aminotransferasa (UL)	350.1 (67)	560.3 (72)*	670.21 (95)*	690.2 (112)*	338.5 (67)	392.5 (109)†	371.1 (101)†	465 (120)†
Asp aminotransferasa (UL)	342.3 (92)	546.8 (101)*	618 (111)*	664.1 (109)*	333.5 (78)	367.8 (71)†	373.8 (94)†	370 (108)†
Lactato deshidrogenasa (UL)	1390 (113)	1229 (303)	4224 (193)*	3018 (251)*	1215 (165)	1121 (150)	1432 (167)†	1615 (174)†
Creatina fosfoquinasa (UL)	3513 (601)	4468 (521)	5901 (851)*	6111 (891)*	3603 (528)	3807 (541)	4012 (321)†	4400 (721)†
Ácido Úrico ( $\mu$ Mol/dL)	20.6 (3.3)	29.9 (2)*	45.4 (1.8)*	47.3 (2.9)*	21.4 (2.1)	20.9 (2.2)†	23.8 (2.8)†	24.5 (2.6)†
Creatinina (mg/dL)	0.57 (0.03)	2.55 (0.42)*	1.99 (0.29)*	1.03 (0.05)*	0.65 (0.05)	1.03 (0.188)†	1.01 (0.11)†	0.89 (0.03)†



**Figura 25. Cambios en el estrés oxidativo, la apoptosis y la autofagia en respuesta a MCC950.**

**(A)** Cálculo densitométrico de los niveles de expresión proteica del antioxidante en tejidos cardíacos de ratones en relación con GAPDH (control de carga).

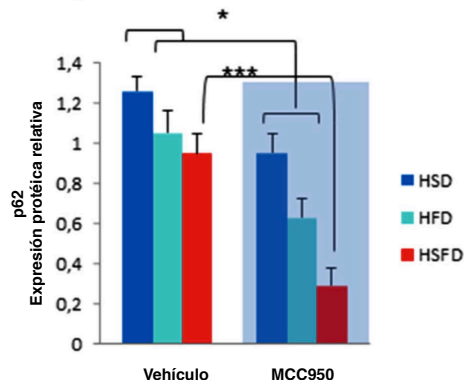
**(B)** Cálculo densitométrico de los niveles de expresión proteica de la proteína Caspasa 3 activa. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM con una transferencia representativa,  $n=4-5$  ratones;  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$  MCC950 vs vehículo.



**Figura 26. Cambios en el estrés oxidativo, la apoptosis y la autofagia en respuesta a MCC950.**

**(A)** Cálculo densitométrico de los niveles de expresión proteica de *Sirt1* en el corazón de ratones.

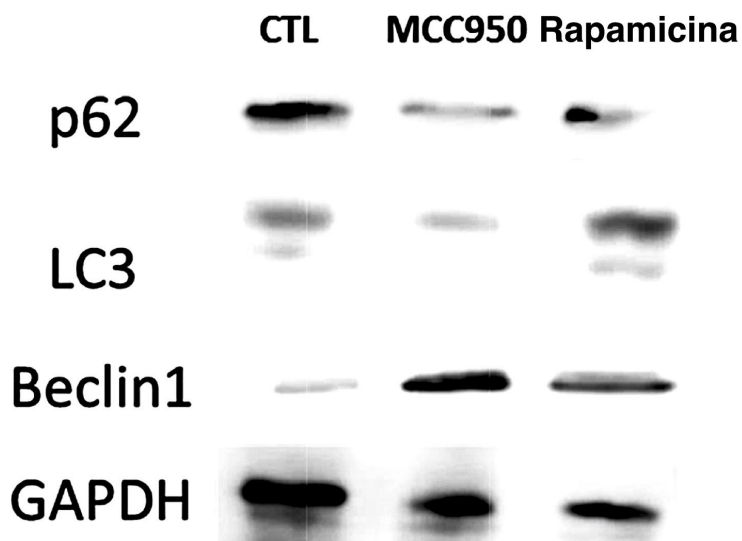
**(B)** La cuantificación densitométrica de los niveles de expresión proteica del marcador de autofagia ATG12 en el corazón en los corazones después de las dietas y el tratamiento con MCC950. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM con una transferencia representativa,  $n=4-5$  ratones;  $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.001$  MCC950 vs vehículo.



**Figura 27. Cambios en el estrés oxidativo, la apoptosis y la autofagia en respuesta a MCC950.** Cuantificación densitométrica de los niveles de expresión proteica del marcador de autofagia p62 en el corazón en los corazones después de las dietas y el tratamiento con MCC950. Todos los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM con una transferencia representativa,  $n=4-5$  ratones; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  MCC950 vs vehículo.

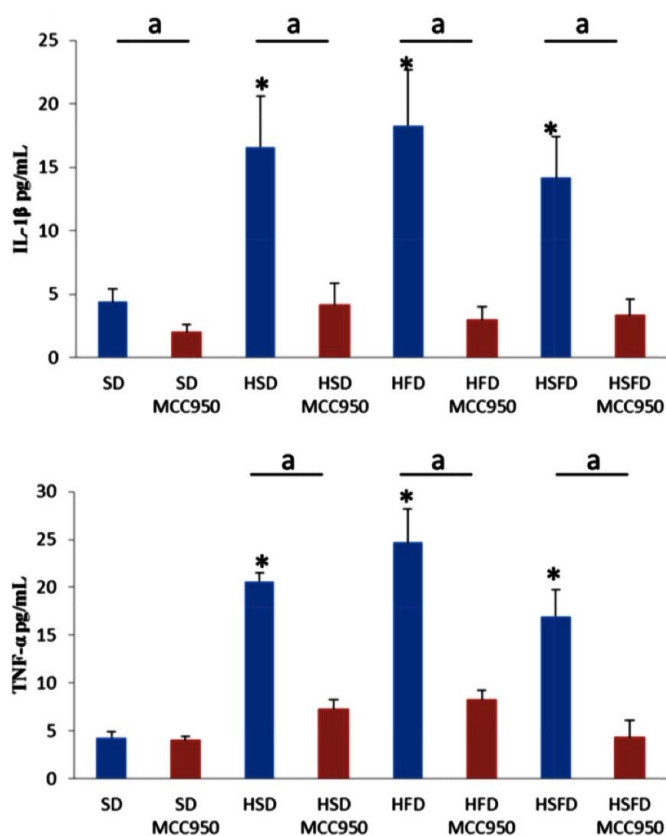
También observamos los mismos mecanismos de protección en tejidos cardíacos determinados por los altos niveles de sobreexpresión de SIRT1 en tejidos cardíacos de grupos tratados con MCC950 (**Figura 24 B** y **Figura 26 A**). De acuerdo con el fenotipo protector NLRP3<sup>-/-</sup>, observamos un aumento de la expresión de proteína ATG12 y LC3II después de las dietas con una acumulación de p62/SQSTM1, que se restauraron después del tratamiento con MCC950 (**Figura 24 B**, **Figura 26 B** y **Figura 27**). Esta inducción de autofagia también se demostró en un experimento in vitro. Las células THP-1 tratadas con este inhibidor mostraron una inducción de autofagia similar a la de la rapamicina con un flujo autofágico mejorado (**Figura 28**). MCC950 también redujo los biomarcadores séricos de inflamación como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  asociados con las diferentes dietas (**Figura 29**).





***Figura 28. Efecto comparativo de MCC950 y rapamicina en la inducción de autofagia en un ensayo in vitro en células THP-1.***

*Análisis Western blot que muestra los marcadores de autofagia acumulación p62/SQSTM1, LC3 y Beclin 1 en las células THP-1.*

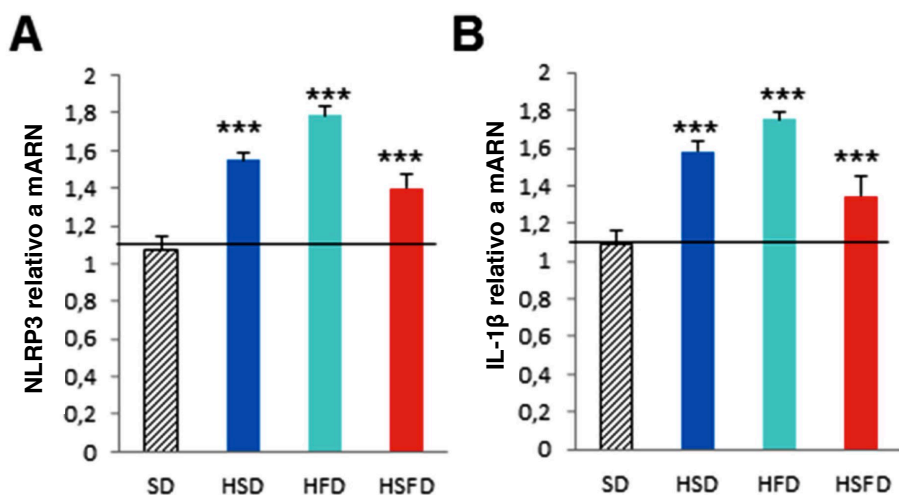


**Figura 29.** Niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el suero de ratones WT-vehículo y MCC950 con obesidad inducida por las dietas HSD, HFD y HSFD se determinaron mediante test ELISA.

## 7.6. El suero de ratones alimentados con HSD, HFD y HSFD induce la activación del inflamasoma y de la inflamación en monocitos

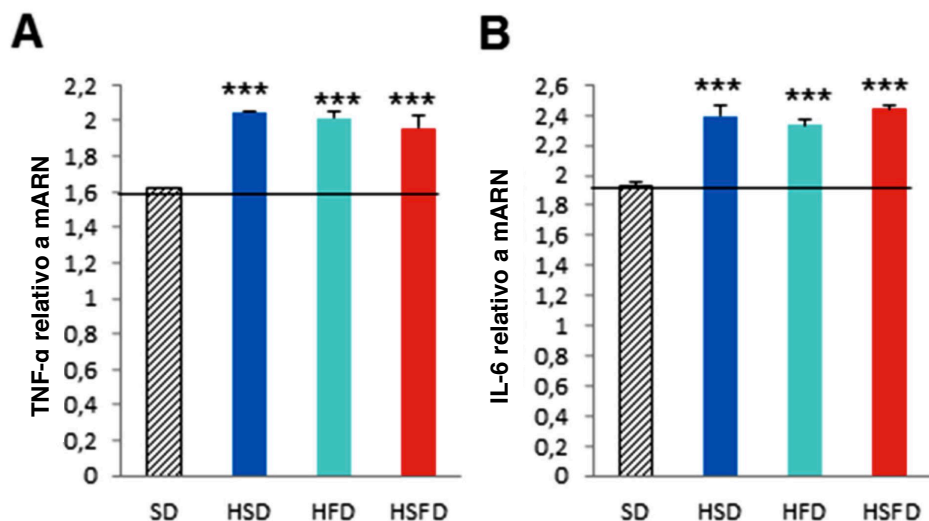
Se sabe que algunos factores circulantes solubles pueden inducir daño cardíaco e inflamación sistémica (Libby, Nahrendorf & Swirski, 2016). A continuación, tratamos de investigar si el suero separado de estos ratones puede inducir estas alteraciones en células cultivadas. Dado que las dietas inducían un aumento de los niveles liberados de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el suero, se podía inducir un fenotipo inflamatorio en las células. Los monocitos de THP-1 se incubaron durante 24 horas con medios que contenían suero de ratones alimentados con dietas SD, HSD, HFS y HSFD durante 15 semanas y se determinaron los perfiles inflamatorios. Nuestros resultados indican que la incubación con estos sueros muestra un aumento en la expresión del gen NLRP3-inflamasoma ( $p < 0.01$ ) e IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ) (**Figura 22 A y B**) y otros genes inflamatorios como TNF- $\alpha$  ( $p$

<0.01) e IL-6 ( $p < 0.01$ ) (**Figura 23 A y B**), que estaban acompañados por liberación de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  al medio (**Figura 24 A y B**). Curiosamente, la incubación con medios que contenían diferentes sueros de ratones alimentados con SD, Dietas HSD, HFS y HSFD y tratados con MCC950 mostraron una reducción en la expresión del inflamasoma ( $p < 0.01$ ) (**Figura 25 A y B**) y otros genes inflamatorios ( $p < 0.01$ ) (**Figura 26 A y B**). Esto puede deberse a la alta unión a proteínas de MCC950 (una sulfonil urea), que da como resultado una cantidad significativa de fármaco en suero, estando disponible para su liberación en el ensayo in vitro.



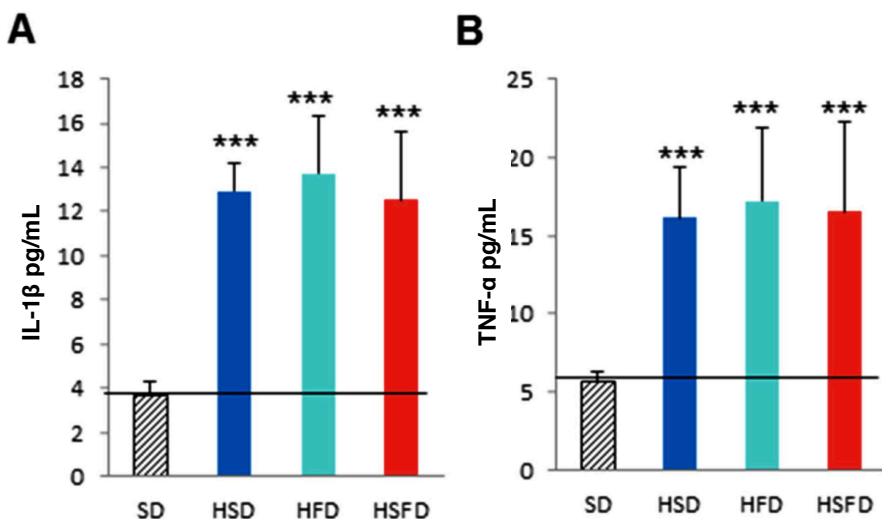
**Figura 30. Efectos pro-inflamasoma y proinflamación en monocitos THP-1 cultivados con diferentes sueros de ratones WT alimentados con dietas HSD, HFD y HSFD.**

(A y B) Expresión génica relativa de NLRP3 e IL-1 $\beta$  determinada por PCR cuantitativa en células THP-1. Los monocitos de THP-1 se evaluaron después de 24 horas de incubación con medios que contenían suero de ratones alimentados con dietas SD, HSD, HFS y HSFD durante 15 semanas. Los gráficos muestran la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.01$ .



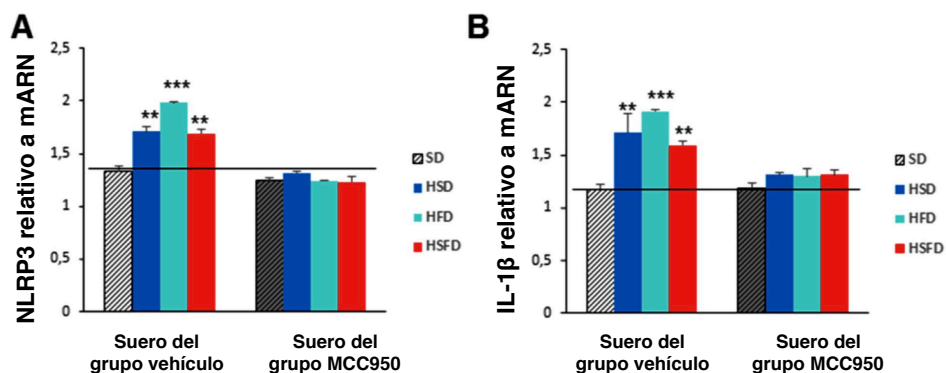
**Figura 31. Efectos pro-inflamasoma y proinflamación en monocitos THP-1 cultivados con diferentes sueros de ratones WT alimentados con dietas HSD, HFD y HSFD.**

(A y B) Expresión génica relativa de TNF- $\alpha$  e IL-6 determinada por PCR cuantitativa en células THP-1. Los monocitos de THP-1 se evaluaron después de 24 horas de incubación con medios que contenían suero de ratones alimentados con dietas SD, HSD, HFS y HSFD durante 15 semanas. Los gráficos muestran la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.01$ .



**Figura 32. Efectos pro-inflamasoma y proinflamación en monocitos THP-1 cultivados con diferentes sueros de ratones WT alimentados con dietas HSD, HFD y HSFD.**

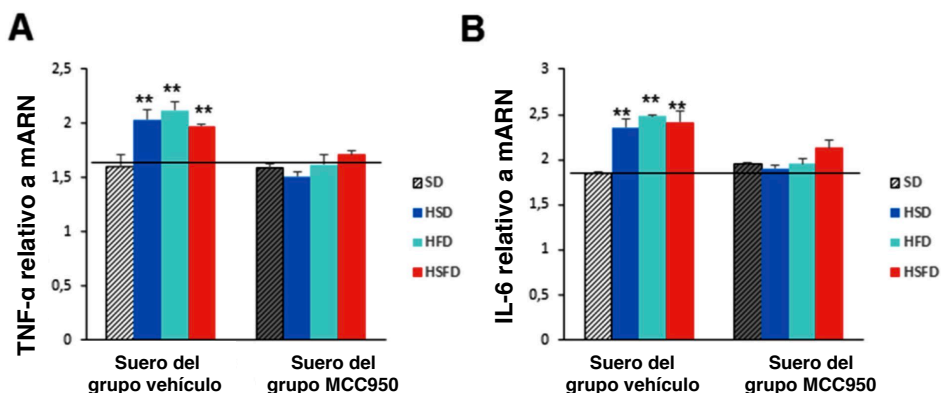
**(A y B)** Liberación media de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  de células THP-1. Los monocitos de THP-1 se evaluaron después de 24 horas de incubación con medios que contenían suero de ratones alimentados con dietas SD, HSD, HFS y HSFD durante 15 semanas. Los gráficos muestran la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \*\*\* $P < 0.01$ .



**Figura 33. Inhibición del inflammasoma en monocitos THP-1 cultivados con sueros de ratones WT tratados con MCC950 alimentados con dietas HSD, HFD y HSFD.**

**(A y B)** Expresión génica relativa de NLRP3 e IL-1 $\beta$  determinada por PCR cuantitativa en células THP-1. Los monocitos de THP-1 se evaluaron después de 24 horas de incubación con medios que contenían suero de ratones alimentados con dietas SD, HSD, HFS y HSFD y ratones alimentados con SD, HSD, HFS y HSFD y tratados con MCC950 durante 15 semanas. Los gráficos muestran la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$ .





**Figura 34. Inhibición del inflammasoma en monocitos THP-1 cultivados con sueros de ratones WT tratados con MCC950 alimentados con dietas HSD, HFD y HSFD.**

(A y B) Expresión génica relativa de TNF- $\alpha$  e IL-6 determinada por PCR cuantitativa en células THP-1. Los monocitos de THP-1 se evaluaron después de 24 horas de incubación con medios que contenían suero de ratones alimentados con dietas SD, HSD, HFS y HSFD y ratones alimentados con SD, HSD, HFS y HSFD y tratados con MCC950 durante 15 semanas. Los gráficos muestran la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

## 8. Discusión

Se ha demostrado que el exceso de nutrición crónico: i) puede inducir la activación de inflammasomas en varios tejidos metabólicos, como tejido adiposo, renal y hepático (Stienstra, van Diepen, Tack, *et al.*, 2011; Boini, Xia, Koka, *et al.*, 2016; Chiazza, Couturier-Maillard, Benetti, *et al.*, 2015), ii) puede activar el NLRP3-inflammasoma en macrófagos (Wen, Gris, Lei, *et al.*, 2011), iii) ha estado involucrado en la inflamación inducida por obesidad y resistencia a la insulina (Vandanmagsar, Youm, Ravussin, *et al.*, 2011), y iv) puede iniciar la inflamación intestinal en las células epiteliales (Progatzky, Sangha, Yoshida, *et al.*, 2014). En este contexto, la activación del NLRP3-inflammasoma, el cual media la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18, ha sido situado como un componente importante de los procesos inflamatorios en enfermedades cardiovasculares (Grundmann, Bode & Moser, 2011; Takahashi, 2014). Los resultados de esta investigación proporcionan datos interesantes de cómo estas dietas

obesogénicas promueven la activación del NLRP3-inflamasoma en el corazón. La alimentación con HSD, HFD y HSFD indujo, no sólo un incremento importante en el peso corporal y cardíaco, sino también un aumento en varios biomarcadores importantes de riesgo cardiovascular, como niveles altos de leptina y ratio leptina/adiponectina (Wannamethee, Shaper, Whincup, *et al.*, 2011), así como alteraciones en varios parámetros bioquímicos y biomarcadores de daño tisular. Estas dietas también inducen daño cardíaco a través del aumento del estrés oxidativo, la inflamación, la apoptosis y un deterioro del proceso de autofagia. En concordancia con la literatura existente, todas estas alteraciones físicas y metabólicas han sido observadas en HFD y HSD, y ambas han estado estrechamente relacionadas con un mayor riesgo de obesidad, enfermedad cardíaca, diabetes (T2D), síndrome metabólico, enfermedad de hígado graso no alcohólico (Rippe & Angelopoulos, 2016).

La autofagia es una vía evolutivamente conservada para la degradación de grandes orgánulos intracelulares y agrega-

dos de proteínas. Es un proceso altamente dinámico, caracterizado por la formación de una vacuola de doble membrana (autofagosoma). Después de fusionarse con los lisosomas, la membrana interna y los componentes del autofagosoma son degradados por los lisosomas, formando una estructura de vacuola de una sola membrana llamada autofagolisosoma/autolisosoma. Es ampliamente aceptado que la autofagia basal posee un papel indispensable en el mantenimiento de la geometría cardíaca y la función en condiciones fisiológicas. Distintos estudios han demostrado un papel indispensable de este proceso en la etiología de las anomalías cardíacas bajo la obesidad y el síndrome metabólico (Ren & Xu, 2015). De hecho, la obesidad inducida por HFD mostró un flujo autofágico deteriorado en el tejido del corazón (He, Bassik, Moresi, *et al.*, 2012), de manera similar a nuestras observaciones, en un estudio en ratones donde los autores examinaron si la autofagia inducida por el ejercicio es necesaria para los efectos metabólicos beneficiosos del entrenamiento a largo plazo, utilizando un modelo de obesidad y tolerancia a la glucosa alterados en la dieta con

alto contenido de grasa. También se ha demostrado que un alto contenido de carbohidratos (fructosa) induce las mismas modificaciones en tejidos hepáticos (Wang, Sun, Zeng, *et al.*, 2015), lo que podría corroborar nuestras observaciones en corazón inducidas por las dietas hipercalóricas. La obesidad se reconoce como una inflamación sistémica crónica de bajo grado que contribuye al desarrollo de varias enfermedades metabólicas y cardiovasculares (Minihane, Vinoy, Russell, *et al.*, 2015). El hecho de los efectos observados se reprodujeran parcialmente en monocitos THP-1 incubados con medio con suero de ratones alimentados con HSD, HFS o HSFD sugiere efectos sistémicos de altos niveles de glucosa, colesterol u otros factores séricos con posible interés para el desarrollo de esta adaptación metabólica e inflamatoria y disfunción autofágica.

El papel del NLRP3-inflamasoma en la enfermedad cardiovascular inducida por HFD y la obesidad ha sido poco estudiado. Sin embargo, se ha asociado el NLRP3 en el tejido adiposo subcutáneo con la gravedad de la aterosclerosis corona-

ria y la prevalencia de enfermedades relacionadas con el estilo de vida (Bando, Fukuda, Soeki, *et al.*, 2015). Un estudio reciente, ha involucrado a distintas variantes genéticas de NLRP3 en la patogénesis de la aterosclerosis (Paramel Varghese, Folkersen, Strawbridge, *et al.*, 2016), y también se ha propuesto al NLRP3-inflamasoma y citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , como nuevos biomarcadores de riesgo cardiovascular (Bullón, Cano-García, Alcocer-Gómez, *et al.*, 2017). En conjunto, estos datos sugieren que la inhibición del complejo inflamasoma, podría ayudar a proteger de la progresión de muchas enfermedades metabólicas y cardiovasculares. Nuestros resultados demuestran que los ratones con inhibición del NLRP3 están protegidos del aumento de peso, la hipertrofia del ventrículo izquierdo, el aumento de la masa miocárdica, y miocardiopatías relacionadas, asociadas a HSD, HFD y HSFD. Ante estas dietas, estos ratones también mostraron la desaparición de diferentes disfunciones relacionadas con el remodelado cardíaco y la ausencia de alteraciones en biomarcadores bioquímicos clave. Todas estas observaciones están en concordancia con las observacio-

nes previas sobre el efecto protector del complejo inflamasoma en ratones y la reducción de los efectos patológicos de HFD (Vandanmagsar, Youm, Ravussin, *et al.*, 2011; Stienstra, van Diepen, Tack, *et al.*, 2011; Wen, Gris, Lei, *et al.*, 2011; Boini, Xia, Koka, *et al.*, 2016; Chiazza, Couturier-Maillard, Benetti, *et al.*, 2015). Sin embargo, de forma similar a estudios previos (Stienstra, van Diepen, Tack, *et al.*, 2011; Youm, Adijiang, Vandanmagsar, *et al.*, 2011), el aumento de los niveles de leptina en ratones con el NLRP3 inhibido fue similar al de los ratones WT en HSD y HFD, mientras que los ratones NLRP3 knockout no mostraron cambios en los niveles de adiponectina cardioprotectora (Pischon, Girman, Hotamisligil, *et al.*, 2004). La delección de NLRP3 también mostró un aumento de estrés oxidativo moderado pero no significativo, que no fue suficiente para inducir la síntesis de antioxidantes en estos animales. Estos resultados se acompañaron por niveles aumentados de TNF-alfa proinflamatorio pero no de IL-1 $\beta$  en animales WT en dietas obesogénicas. Sin embargo, los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> mostraron aumentos moderados de mediadores proinflamatorios, apo-

yando la idea de que estos animales knockout están más protegidos de los daños inducidos por estas dietas. Además de estas observaciones, se observó una inducción de apoptosis reducida en ratones NLRP3<sup>-/-</sup> con una expresión aumentada de Bcl-2 anti-apoptótico y Sirt1, una histona deacetilasa de clase III dependiente de NAD<sup>+</sup>, que se ha demostrado que protege contra la disfunción endotelial, la aterotrombosis, la obesidad inducida por la dieta, la diabetes tipo 2, la esteatosis hepática y el infarto de miocardio (Winnik, Auwerx, Sinclair, *et al.*, 2015). En este sentido, los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> no mostraron modificaciones en la expresión génica de posibles disfunciones vasculares y reguladores de la fibrosis inducida en los tejidos del corazón por las dietas. Curiosamente, estudios muy recientes han demostrado que los ratones deficientes en componentes del inflammasoma son resistentes a la disfunción endotelial y la fibrosis inducida por diferentes daños en el hígado, pulmón o riñón, de forma similar a nuestras observaciones en el corazón (Wree, McGeough, Peña, *et al.*, 2014; Krishnan, Dowling, Ling, *et al.*, 2016; Stout-Delgado, Cho, Chu, *et al.*, 2016). En células de ma-



míferos, Sirt1 modula distintas vías metabólicas y de respuesta al estrés, incluida la autofagia (Tanno, Kuno, Horio, *et al.*, 2012), por lo que la expresión incrementada de esta proteína en ratones NLRP3<sup>-/-</sup> podría mejorar la capacidad de adaptación metabólica y/o protección cardiovascular. Del mismo modo, los ratones NLRP3<sup>-/-</sup> mostraron un flujo de autofagia muy eficiente. Colectivamente, todos estos estudios y los hallazgos recientes de que estos ratones también tienen un flujo de autofagia eficiente en tejidos del pulmón y una mejor resistencia a la hiperoxia (Zhang, Sauler, Shinn, *et al.*, 2014) indican que la deficiencia de NLRP3 protege notablemente a diferentes órganos de situaciones de estrés, como las dietas obesogénicas.

Recientemente se ha demostrado que la inhibición de la activación del inflamasoma induce un efecto protector importante en la lesión cardíaca. Abderrazak y cols., demostraron una inhibición del NLRP3-inflamasoma e inducción de la autofagia, además de casi normalizar el colesterol y los triglicéridos en plasma en ratones ApoE2 KO con dieta alta en grasas tras

ser tratados con un producto natural llamado arglabin (Abderrazak, Couchie, Mahmood, *et al.*, 2015). Otro inhibidor nuevo llamado 16673-34-0, un sustrato intermedio de la síntesis de gliburida libre del resto ciclohexilurea, tiene un potente efecto inhibidor que limita la respuesta inflamatoria secundaria y reduce el tamaño del infarto en un modelo murino de lesión miocárdica aguda por isquemia-reperfusión (Marchetti, Chojnacki, Toldo, *et al.*, 2014). Más recientemente, en un estudio ciego aleatorizado de infarto de miocardio en animales grandes, se ha demostrado que la administración intravenosa a diario de MCC950 durante 7 días reduce los niveles de IL-1 $\beta$  activa en el miocardio, culmina en una preservación de la función cardíaca pronunciada y la reducción del tamaño del infarto (van Hout, Bosch, Ellenbroek, *et al.*, 2017). En nuestro estudio, hemos estudiado por primera vez el efecto protector del mismo inhibidor selectivo en tejidos cardiacos de animales alimentados con dietas obesogénicas. Observamos que la administración intraperitoneal diaria de MCC950 previene el aumento de peso, la ganancia de peso cardíaco, incremento de la adiponec-

tina circulante y se mantienen los niveles de leptina y leptina/adiponectina asociados a HSD, HFD y HSFD, en línea con este papel protector. Nuestro estudio también revela que otros marcadores circulantes de daño tisular e inflamación se ven reducidos en los animales tratados con MCC950. Además, nuestros resultados de los ratones tratados con MCC950 reprodujeron los observados previamente con ratones NLRP3<sup>-/-</sup> bajo estrés oxidativo, que mostraron una reducción de la apoptosis e inducción de la expresión de Sirt1 acompañada de un flujo de autofagia mejorado en los tejidos cardíacos.

Finalmente, estudios *in vitro* previos, han observado adaptaciones metabólicas e inflamatorias beneficiosas en células tratadas con suero de animales alimentados con HFD + Resveratrol debido al efecto antiinflamatorio y la sobreexpresión de Sirt1 inducida por este compuesto (Jimenez-Gomez, Mattison, Pearson, *et al.*, 2013; Baur, Pearson, Price, *et al.*, 2006). En concordancia con estos estudios, observamos que los monocitos THP-1 tratados en medios de cultivo suplemen-

tados con suero de ratones alimentados con dietas HSD, HFD o HSFD + MCC950 presentaban una expresión de ARNm más baja en el inflammasoma (NLRP3 e IL-1 $\beta$ ) y en la inflamación (TNF- $\alpha$  e IL-6) en comparación con los animales sobrealimentados crónicos. Tomados en conjunto, estos datos indican que los monocitos podrían contribuir, al menos en parte, a los efectos beneficiosos de MCC950 en la inflamación sistémica.

## 9. Conclusiones

En conclusión, nuestros datos sugieren que:

1. La inhibición de NLRP3-inflamasoma produce beneficios metabólicos, inflamatorios y podría inducir adaptaciones autofágicas en el corazón de los modelos de ratones obesos inducidos por la dieta.
2. Además, es posible que los monocitos participen en el daño cardíaco inducido por la inflamación sistémica después de la exposición crónica a dietas poco saludables.
3. Aunque los cambios en el estilo de vida son las principales intervenciones para prevenir la obesidad y los consiguientes problemas cardíacos asociadas a las dietas obesogénicas, los daños ocasionados en los tejidos cardíacos después de hábitos no saludables prolongados pueden

ser irreversibles. En estos casos, el uso de inhibidores del inflammasoma como MCC950, con una posible adaptación autofágica de los tejidos, podría utilizarse como terapia para reducir el daño cardíaco y los cambios metabólicos, que genera la ECV.



## 10. Bibliografía

Abbate, A. (2013) The heart on fire: inflammasome and cardiomyopathy. *Experimental Physiology*. 98 (2), 385.

Abderrazak, A., Couchie, D., Mahmood, D.F.D., Elhage, R., et al. (2015) Anti-inflammatory and antiatherogenic effects of the NLRP3 inflammasome inhibitor arglabin in ApoE2.Ki mice fed a high-fat diet. *Circulation*. 131 (12), 1061–1070.

Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., Hadri, K. El, et al. (2015) NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox biology*. 4296–307. Available from: doi:10.1016/j.redox.2015.01.008.

Alfaidi, M., Wilson, H., Daigneault, M., Burnett, A., et al. (2015) Neutrophil elastase promotes interleukin-1 $\beta$  secretion from human coronary endothelium. *The Journal of biological chemistry*. 290 (40), 24067–24078. Available from: doi:10.1074/jbc.M115.659029.



Anon (1961) Dietary fat and its relation to heart attacks and strokes. report by the central committee for medical and community program of the american heart association. 175389-391.

Ballal, K., Wilson, C.R., Harmancey, R. & Taegtmeyer, H. (2010) Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. *Molecular and cellular biochemistry*. 344 (1), 221-230.

Bando, S., Fukuda, D., Soeki, T., Nishimoto, S., et al. (2015) Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 242 (2), 407-414.

Barnes, P.J. & Karin, M. (1997) Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England journal of medicine*. 336 (15), 1066-1071.

Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., et al. (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 183 (2), 787-791.

Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., et al. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 444 (7117), 337–342.

Boini, K.M., Xia, M., Koka, S., Gehr, T.W., et al. (2016) Instigation of NLRP3 inflammasome activation and glomerular injury in mice on the high fat diet: role of acid sphingomyelinase gene. *Oncotarget*. 7 (14), 19031–19044.

Brittany Butts, R.N., Rebecca A Gary, P.R., Sandra B Dunbar, P.R. & Javed Butler, M.D.M.P.H. (2015) The importance of nLRP3 inflammasome in heart failure. *Journal of Cardiac Failure*. 21 (7), 1–23.

Bullón, P., Cano-García, F.J., Alcocer-Gómez, E., Varela-López, A., et al. (2017) Could NLRP3–Inflammasome Be a Cardiovascular Risk Biomarker in Acute Myocardial Infarction Patients? *Antioxidants & Redox Signaling*. 27 (5), 269–275.

Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., et al. (2014) Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation. *Cell*. 156 (6), 1207–1222.

Calder, P.C., Albers, R., Antoine, J.-M., Blum, S., et al. (2009) Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *British Journal of Nutrition*. 101 Suppl 1 (S1), NaN – NaN.

Chamberlain, J., Evans, D., King, A., Dewberry, R., et al. (2006) Interleukin-1beta and signaling of interleukin-1 in vascular wall and circulating cells modulates the extent of neointima formation in mice. *The American journal of pathology*. 168 (4), 1396–1403.

Chiazza, F., Couturier-Maillard, A., Benetti, E., Mastrocola, R., et al. (2015) Targeting the NLRP3 inflammasome to reduce diet-induced metabolic abnormalities in mice. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 21 (1), 1–13. Available from: doi:10.2119/molmed.2015.00104.

Chung, E.S., Packer, M., Lo, K.H., Fasanmade, A.A., et al. (2003) Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation*. 107 (25), 3133–3140.

Cioranescu, A. (1955) *Historia de la conquista de las siete islas de canarias*.

Coll, R.C., Robertson, A.A.B., Chae, J.J., Higgins, S.C., et al. (2015) A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nature medicine*. 21 (3), 248–255.

Cordero, M.D., Williams, M.R. & Ryffel, B. (2018) AMP-Activated Protein Kinase Regulation of the NLRP3 Inflammasome during Aging. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 29 (1), 8–17.

Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., et al. (2005) Metabolic syndrome: A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. 111 (11), 1448–1454.

Davies, M.J. (1996) Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 94 (8), 2013–2020.

Davis, B.K., Wen, H. & Ting, J.P.-Y. (2011) The inflammasome nLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual Review of Immunology*. 29 (1), 707–735.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., et al. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 399 (6736), 601–605.

Dinarello, C.A. & van der Meer, J.W.M. (2013) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Seminars in immunology*. 25 (6), 469–484.

DiNicolantonio, J.J., Lucan, S.C. & O’Keefe, J.H. (2016) The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. *Progress in Cardiovascular Diseases*. 58 (5), 1–9.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., et al. (2010) NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 464 (7293), 1357–1361. Available from: doi:10.1038/nature08938.

Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R.N. & Montminy, M. (2003) TRB3: A tribbles homolog that inhibits akt/PKB activation by insulin in liver. *Science*. 300 (5625), 1574–1577.

El-Menyar, A.A. (2008) Cytokines and myocardial dysfunction: state of the art. *Journal of Cardiac Failure*. 14 (1), 61–74.

Emanuelli, B., Peraldi, P., Filloux, C., Chavey, C., et al. (2001) SOCS-3 inhibits insulin signaling and is up-regulated in response to tumor necrosis factor- $\alpha$  in the adipose tissue of obese mice. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (51), 47944–47949.

Falk, E., Shah, P.K. & Fuster, V. (1995) Coronary plaque disruption. *Circulation*. 92 (3), 657–671.

Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O.H., Andersen, P.S. & Girardin, S.E. (2006) Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clinical and Experimental Immunology*. 147 (2), 227–235.

Franchi, L., Eigenbrod, T. & Nuñez, G. (2009) Cutting edge: TNF- $\alpha$  mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3

inflammasome in the absence of microbial stimulation. *Journal of immunology*. 183 (2), 792–796.

Franchi, L., Muñoz-Planillo, R. & Nuñez, G. (2012) Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature Immunology*. 13 (4), 325–332.

Frostegård, J., Ulfgren, A.K., Nyberg, P., Hedin, U., et al. (1999) Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 145 (1), 33–43.

Gage, J., Hasu, M., Thabet, M. & Whitman, S.C. (2012) Caspase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *The Canadian journal of cardiology*. 28 (2), 222–229.

Galland, L. (2010) Diet and inflammation. *Nutrition in Clinical Practice*. 25 (6), 634–640.

Gil, Á. & de Medina Contreras, F.S. (2005) *Tratado de nutrición*. . Acción Médica.

Glass, C.K. & Olefsky, J.M. (2012) Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell metabolism*. 15 (5), 635–645.

Grundmann, S., Bode, C. & Moser, M. (2011) Inflammasome activation in reperfusion injury: friendly fire on myocardial infarction? *Circulation*. 123 (6), 574–576.

Guo, H., Callaway, J.B. & Ting, J.P.-Y. (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature medicine*. 21 (7), 677–687.

Hackett, D., Davies, G. & Maseri, A. (1988) Pre-existing coronary stenoses in patients with first myocardial infarction are not necessarily severe. *European heart journal*. 9 (12), 1317–1323.

Haehling, S. von, Schefold, J.C., Lainscak, M., Doehner, W., et al. (2009) Inflammatory biomarkers in heart failure revisited: much more than innocent bystanders. *Heart failure clinics*. 5 (4), 549–560.



Haffner, S.M. (2006) The metabolic syndrome: Inflammation, diabetes mellitus, and cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*. 97 (2), 3–11.

Hallenbeck, J.M., Hansson, G.K. & Becker, K.J. (2005) Immunology of ischemic vascular disease: plaque to attack. *Trends in immunology*. 26 (10), 550–556.

Hansson, G.K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 352 (16), 1685–1695.

Hansson, G.K., Holm, J. & Jonasson, L. (1989) Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *The American journal of pathology*. 135 (1), 169–175.

Hazuda, D.J., Strickler, J., Kueppers, F., Simon, P.L., et al. (1990) Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *Journal of Biological Chemistry*. 265 (11), 6318–6322.

He, C., Bassik, M.C., Moresi, V., Sun, K., et al. (2012) Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*. 481 (7382), 511–515.

Van der Heijden, T., Kritikou, E., Venema, W., van Duijn, J., et al. (2017) NLRP3 Inflammasome Inhibition by MCC950 Reduces Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 37 (8), NaN – NaN.

Heneka, M.T., Kummer, M.P., Stutz, A., Delekate, A., et al. (2013) NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*. 493 (7434), 674–678.

He, Y., Hara, H. & Nuñez, G. (2016) Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences*. 41 (12), 1012–1021.

Hofmann, U. & Frantz, S. (2013) How can we cure a heart 'in flame'? A translational view on inflammation in heart failure. *Basic research in cardiology*. 108 (4), 356.

Hotamisligil, G.S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 444 (7121), 860–867.

Van Hout, G.P.J., Bosch, L., Ellenbroek, G.H.J.M., de Haan, J.J., et al. (2017) The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *European heart journal*. 38 (11), 828–836.

Hsu, H.-C., Chen, C.-Y., Lee, B.-C. & Chen, M.-F. (2016) High-fat diet induces cardiomyocyte apoptosis via the inhibition of autophagy. *European Journal of Nutrition*. 55 (7), 2245–2254.

Huang, Y., Jiang, H., Chen, Y., Wang, X., et al. (2018) Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases. *EMBO molecular medicine*. 10 (4), e8689.

Janeway, C.A. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 54 Pt 11–13.

Jiang, H., He, H., Chen, Y., Huang, W., et al. (2017) Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat

inflammatory disorders. *The Journal of experimental medicine*. 214 (11), 3219–3238.

Jiang, Z.Y., Hunt, J.V. & Wolff, S.P. (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical biochemistry*. 202 (2), 384–389.

Jimenez-Gomez, Y., Mattison, J.A., Pearson, K.J., Martín-Montalvo, A., et al. (2013) Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet. *Cell metabolism*. 18 (4), 533–545.

Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G., et al. (1986) Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*. 6 (2), 131–138.

Juliana, C., Fernandes-Alnemri, T., Kang, S., Farias, A., et al. (2012) Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate

NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of biological chemistry*. 287 (43), 36617–36622.

Keys, A., Anderson, J.T. & Grande, F. (1965) Serum cholesterol response to changes in the diet: II. the effect of cholesterol in the diet. *Metabolism: clinical and experimental*. 14 (7), 759–765.

Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 12 (1), 1–222.

Kovanen, P.T., Kaartinen, M. & Paavonen, T. (1995) Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*. 92 (5), 1084–1088.

Krishnan, S.M., Dowling, J.K., Ling, Y.H., Diep, H., et al. (2016) Inflammasome activity is essential for one kidney/ deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *British Journal of Pharmacology*. 173 (4), 752–765.

Lamkanfi, M. & Dixit, V.M. (2014) Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 157 (5), 1013–1022.

Land, W., Schneeberger, H., Schleibner, S., Illner, W.D., et al. (1994) The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation*. 57 (2), 211–217.

Libby, P., Nahrendorf, M. & Swirski, F.K. (2016) Leukocytes Link Local and Systemic Inflammation in Ischemic Cardiovascular Disease: An Expanded 'Cardiovascular Continuum'. *Journal of the American College of Cardiology*. 67 (9), 1091–1103.

Linton, P.-J., Gurney, M., Sengstock, D., Mentzer, R.M., et al. (2015) This old heart: Cardiac aging and autophagy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 8344–54.

Liu, S., Manson, J.E., Buring, J.E., Stampfer, M.J., et al. (2002) Relation between a diet with a high glycemic load and plasma concentrations of high-sensitivity c-reactive protein in middle-aged women. *The American journal of clinical nutrition*. 75 (3), 492–498.

López, J.C.H. & Inchima, S.U. (2012) Activation and regulation of inflammasome NLRP3 in infectious diseases. 25 (4), 380–390.

Lu, A., Magupalli, V.G., Ruan, J., Yin, Q., et al. (2014) Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. *Cell*. 156 (6), 1193–1206.

Marchetti, C., Chojnacki, J., Toldo, S., Mezzaroma, E., et al. (2014) A novel pharmacologic inhibitor of the NLRP3 inflammasome limits myocardial injury after ischemia-reperfusion in the mouse. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 63 (4), 316–322.

Martinon, F., Mayor, A. & Tschopp, J. (2009) The inflammasomes: Guardians of the body. *Annual Review of Immunology*. 27 (1), 229–265.

Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology*. 12 (1), 991–1045.

Menu, P., Pellegrin, M., Aubert, J.-F., Bouzourene, K., et al. (2011) Atherosclerosis in apoE-deficient mice progresses independently of the nLRP3 inflammasome. 2 (3), e137–4.

Minihane, A.M., Vinoy, S., Russell, W.R., Baka, A., et al. (2015) Low-grade inflammation, diet composition and health: current

research evidence and its translation. *British Journal of Nutrition*. 114 (7), 999–1012.

Mintz, S.W. (1985) *Sweetness and power*. Viking Pr.

Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., et al. (2012) Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (28), 11282–11287.

Packer, M. (1992) The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progression in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 20 (1), 248–254.

Panagiotakos, D.B., Pitsavos, C., Yannakoulia, M., Chrysoshoou, C., et al. (2005) The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The aTTICA study. *Atherosclerosis*. 183 (2), 308–315.

Paramel Varghese, G., Folkersen, L., Strawbridge, R.J., Halvorsen, B., et al. (2016) NLRP3 Inflammasome Expression and



Activation in Human Atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association*. 5 (5), e003031.

Pavillard, L.E., Marín-Aguilar, F., Bullón, P. & Cordero, M.D. (2018) Cardiovascular diseases, NLRP3 inflammasome, and western dietary patterns. *Pharmacological Research*. 13144–50.

Pischon, T., Girman, C.J., Hotamisligil, G.S., Rifai, N., et al. (2004) Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*. 291 (14), 1730–1737.

Progatzky, F., Sangha, N.J., Yoshida, N., McBrien, M., et al. (2014) Dietary cholesterol directly induces acute inflammasome-dependent intestinal inflammation. *Nature communications*. 55864.

Rajakumar, K. (2001) Infantile scurvy: A historical perspective. *Pediatrics*. 108 (4), E76–e76.

Ramos, E.J.B., Xu, Y., Romanova, I., Middleton, F., et al. (2003) Is obesity an inflammatory disease? *Surgery*. 134 (2), 329–335.

Ren, S.Y. & Xu, X. (2015) Role of autophagy in metabolic syndrome-associated heart disease. *Biochimica et biophysica acta*. 1852 (2), 225–231.

Ridker, P.M., Howard, C.P., Walter, V., Everett, B., et al. (2012) Effects of interleukin-1 $\beta$  inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation*. 126 (23), 2739–2748.

Ridker, P.M., Thuren, T., Zalewski, A. & Libby, P. (2011) Interleukin-1 $\beta$  inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *American heart journal*. 162 (4), 597–605.

Rippe, J.M. & Angelopoulos, T.J. (2013) Sucrose, high-fructose corn syrup, and fructose, their metabolism and potential health effects: What do we really know? *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 4 (2), 236–245.

Rippe, J.M. & Angelopoulos, T.J. (2016) Sugars, obesity, and cardiovascular disease: results from recent randomized control trials. *European Journal of Nutrition*. 5545–53.

Rodgers, M.A., Bowman, J.W., Fujita, H., Orazio, N., et al. (2014) The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of experimental medicine*. 211 (7), 1333–1347.

Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., et al. (2002) SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (44), 42394–42398.

Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M.E. (2002) Release of chromatin protein hMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*. 418 (6894), 191–195.

Schroder, K., Zhou, R. & Tschopp, J. (2010) The nLRP3 inflammasome: A sensor for metabolic danger? *Science*. 327 (5963), 296–300.

Senn, J.J., Klover, P.J., Nowak, I.A., Zimmers, T.A., et al. (2003) Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (16), 13740–13746.

Seta, Y., Shan, K., Bozkurt, B., Oral, H., et al. (1996) Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. *Journal of Cardiac Failure*. 2 (3), 243–249.

Shi, Y., Evans, J.E. & Rock, K.L. (2003) Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*. 425 (6957), 516–521.

Sokolowska, M., Chen, L.-Y., Liu, Y., Martinez-Anton, A., et al. (2015) Prostaglandin E2 Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation through EP4 Receptor and Intracellular Cyclic AMP in Human Macrophages. *Journal of immunology*. 194 (11), 5472–5487.

Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., et al. (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the

Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 92 (5), 1355–1374.

Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., et al. (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 89 (5), 2462–2478.

Stienstra, R., van Diepen, J.A., Tack, C.J., Zaki, M.H., et al. (2011) Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (37), 15324–15329.

Stout-Delgado, H.W., Cho, S.J., Chu, S.G., Mitzel, D.N., et al. (2016) Age-Dependent Susceptibility to Pulmonary Fibrosis Is Associated with NLRP3 Inflammasome Activation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 55 (2), 252–263.

Strowig, T., Henao-Mejia, J., Elinav, E. & Flavell, R. (2012) Inflammasomes in health and disease. *Nature*. 481 (7381), 278–286.

Sutterwala, F.S., Haasken, S. & Cassel, S.L. (2014) Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1319 (1), 82–95.

Takahashi, M. (2014) NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *International heart journal*. 55 (2), 101–105.

Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., et al. (2012) PAMPs and dAMPs: Signals that spur autophagy and immunity. *Immunological reviews*. 249 (1), 158–175.

Tanno, M., Kuno, A., Horio, Y. & Miura, T. (2012) Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic research in cardiology*. 107 (4), 273.

Theuma, P. & Fonseca, V.A. (2003) Inflammation and emerging risk factors in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Current Diabetes Reports*. 3 (3), 248–254.

Tschopp, J. & Schroder, K. (2010) NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature Reviews Immunology*. 10 (3), 210–215.

Usui, F., Shirasuna, K., Kimura, H., Tatsumi, K., et al. (2012) Critical role of caspase-1 in vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-fed apolipoprotein E-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 425 (2), 162–168.

Vanaja, S.K., Rathinam, V.A.K. & Fitzgerald, K.A. (2015) Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends in cell biology*. 25 (5), 308–315.

Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., et al. (2011) The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nature medicine*. 17 (2), 179–188.

Vénéreau, E., Ceriotti, C. & Bianchi, M.E. (2015) DAMPs from cell death to new life. *Frontiers in Immunology*. 6, 422.

Visscher, T.L. & Seidell, J.C. (2001) The public health impact of obesity. *Annual review of public health*. 22 (1), 355–375.

Van der Wal, A.C., Becker, A.E., van der Loos, C.M. & Das, P.K. (1994) Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary

atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 89 (1), 36–44.

Wang, H., Sun, R.-Q., Zeng, X.-Y., Zhou, X., et al. (2015) Restoration of autophagy alleviates hepatic ER stress and impaired insulin signalling transduction in high fructose-fed male mice. *Endocrinology*. 156 (1), 169–181.

Wang, L., Chen, Y., Li, X., Zhang, Y., et al. (2016) Enhancement of endothelial permeability by free fatty acid through lysosomal cathepsin B-mediated Nlrp3 inflammasome activation. *Oncotarget*. 7 (45), 73229–73241.

Wannamethee, S.G., Shaper, A.G., Whincup, P.H., Lennon, L., et al. (2011) Obesity and risk of incident heart failure in older men with and without pre-existing coronary heart disease: does leptin have a role? *Journal of the American College of Cardiology*. 58 (18), 1870–1877.



Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., et al. (2011) Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nature Publishing Group*. 12 (5), 408–415.

Williams, K.J. & Tabas, I. (2002) Atherosclerosis and inflammation. *Science*. 297 (5581), 521–522.

Winnik, S., Auwerx, J., Sinclair, D.A. & Matter, C.M. (2015) Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *European heart journal*. 36 (48), 3404–3412.

Wree, A., McGeough, M.D., Peña, C.A., Schlattjan, M., et al. (2014) NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *Journal of Molecular Medicine*. 92 (10), 1069–1082.

Yan, Y., Jiang, W., Liu, L., Wang, X., et al. (2015) Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell*. 160 (1), 62–73.

Yan, Y., Jiang, W., Spinetti, T., Tardivel, A., et al. (2013) Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder

through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity*. 38 (6), 1154–1163.

Youm, Y.-H., Adijiang, A., Vandanmagsar, B., Burk, D., et al. (2011) Elimination of the NLRP3-ASC Inflammasome Protects against Chronic Obesity-Induced Pancreatic Damage. *Endocrinology*. 152 (11), 4039–4045.

Youm, Y.-H., Grant, R.W., McCabe, L.R., Albarado, D.C., et al. (2013) Canonical Nlrp3 Inflammasome Links Systemic Low-Grade Inflammation to Functional Decline in Aging. *Cell Metabolism*. 18 (4), 519–532.

Youm, Y.-H., Nguyen, K.Y., Grant, R.W., Goldberg, E.L., et al. (2015) The ketone metabolite  $\beta$ -hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature medicine*. 21 (3), 263–269.

Zhang, Y., Sauler, M., Shinn, A.S., Gong, H., et al. (2014) Endothelial PINK1 mediates the protective effects of NLRP3 deficiency during lethal oxidant injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 192 (11), 5296–5304.

Zheng, F., Xing, S., Gong, Z., Mu, W., et al. (2014) Silence of NLRP3 suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Mediators of inflammation*. 2014 (1), 507208–8.



# NLRP3-inflammasome inhibition prevents high fat and high sugar diets-induced heart damage through autophagy induction

Luís E. Pavillard<sup>1,\*</sup>, Diego Cañadas-Lozano<sup>1,\*</sup>, Elísabet Alcocer-Gómez<sup>1</sup>, Fabiola Marín-Aguilar<sup>1</sup>, Sheila Pereira<sup>2</sup>, Avril A. B. Robertson<sup>3</sup>, Jordi Muntané<sup>4,7</sup>, Bernhard Ryffel<sup>5</sup>, Matthew A. Cooper<sup>3</sup>, José L. Quiles<sup>8</sup>, Pedro Bullón<sup>1,\*\*</sup>, Jesús Ruiz-Cabello<sup>6,\*\*</sup> and Mario D. Cordero<sup>8,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Research Laboratory, Oral Medicine Department, University of Sevilla, Sevilla, Spain

<sup>2</sup>Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), "Virgen del Rocío" University Hospital/IBiS/CSIC/University of Seville, Seville, Spain

<sup>3</sup>Institute for Molecular Bioscience, The University of Queensland, Brisbane, Australia

<sup>4</sup>Department of General Surgery, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

<sup>5</sup>University and CNRS, UMR7355, Orléans, France

<sup>6</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain; Advanced Imaging Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, and Universidad Complutense Madrid, Madrid, Spain

<sup>7</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD o Ciberehd), Instituto de Salud Carlos III, Spain

<sup>8</sup>Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix Verdú", Department of Physiology, Biomedical Research Center, University of Granada, Granada, Spain

\* These authors have contributed equally to this work

\*\* Co-senior author

**Correspondence to:** Mario D. Cordero, **email:** mdcormor@ugr.es

**Keywords:** NLRP3-inflammasome, cardiac damage, autophagy, MCC950

**Received:** June 28, 2017

**Accepted:** July 29, 2017

**Published:** September 08, 2017

**Copyright:** Pavillard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## ABSTRACT

**The NLRP3-inflammasome complex has emerged as an important component of inflammatory processes in metabolic dysfunction induced by high-caloric diets. In this study, we investigate the molecular mechanisms by which NLRP3 inhibition may attenuate diet-induced cardiac injury. Here we show the cardiac damage induced by high sugar diet (HSD), high fat diet (HFD) or high sugar/fat diet (HSFD) over 15 weeks. Genetic ablation of NLRP3 protected against this damage by autophagy induction and apoptotic control. Furthermore, NLRP3 inhibition by the selective small molecule MCC950 resulted in similar autophagy induction and apoptotic control in hearts after diets. These data were reproduced in THP-1 cells treated with MCC950 and cultured in media supplemented with serum from mice dosed with MCC950 and fed with diets. NLRP3 inhibition exerted beneficial metabolic, and autophagic adaptations in hearts from obesogenic diets. The inhibition of NLRP3 activation may hold promise in the treatment of metabolic and cardiovascular diseases.**

## INTRODUCTION

Cardiovascular disease (CVD) is the leading cause of death in the world with a high prevalence both

in industrialized but also in low- and middle-income countries [1]. Studies show that only about 8% US adults had a low risk profile for cardiovascular disease between 1999 and 2004 [2]. In Spain, the level of ideal

cardiovascular health is as low as in the United States [3]. Energy-rich diets high in fat, processed and refined carbohydrate foods, together with sedentary lifestyles have led to an increased CVD risk, and this effect is thought to be mediated primarily by elevated LDL cholesterol blood levels. In these cases, the role of obesity is especially relevant because multifactorial pathophysiological mechanisms interrelate this condition with other diseases such as type 2 diabetes, renal disease, and metabolic syndrome. All these obesity-induced complications share a low-grade systemic inflammatory response characterized by upregulated cytokine production and activated signaling pathways [4], yet the specific inflammation-related signaling pathways contributing to the metabolic dysfunction are still unknown. On this respect, the NLRP3-inflammasome complex has been described as a 'danger sensor', which triggers an innate immune response to a multitude of endogenous metabolic danger patterns inducing sterile inflammation [5]. NLRP3 activation induces the recruitment and autocatalytic activation of the cysteine protease caspase-1, which processes the cytosolic precursors of the related cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18, and leads to the secretion of the biologically active form of these cytokines [6].

Mice fed with HFD developed NLRP3-inflammasome activation in adipose, renal and hepatic tissues [7–9]. Interestingly, the absence of NLRP3 in these animals protected them to the adverse effects of HFD and the development of pathophysiology [7–9]. However, the role of NLRP3 in the pathogenesis of HFD-induced CVD appearance has not been characterized. Recent observations identified a specific role for NLRP3-inflammasome in the maladaptive response in cardiac tissue after ischemia/reperfusion in mice under high-fat high-fructose diets [10] and in the diabetic cardiomyopathy observed after HFD and streptozotocin treatment in rats [11]. To understand the role of the NLRP3-inflammasome in diet induced-cardiac damage, we assessed the response of NLRP3  $-/-$  mice, and the effect of the NLRP3 inhibitor MCC950 on high sugar diet (HSD), HFD and high sugar/fat diet (HSFD).

## RESULTS

### Absence of the NLRP3 protects from HSD, HFD and HSFD-induced obesity

We have investigated the role of the NLRP3-inflammasome in mice lacking the NLRP3 gene and exposed to the different diets inducing obesity. Food intake and bodyweight evolution were examined weekly during 15 weeks in each group. The different diets have been shown to induce significant weight gain in WT mice (Figures 1A and 1B) [7] despite increased food consumption that was similar in all WT and NLRP3-

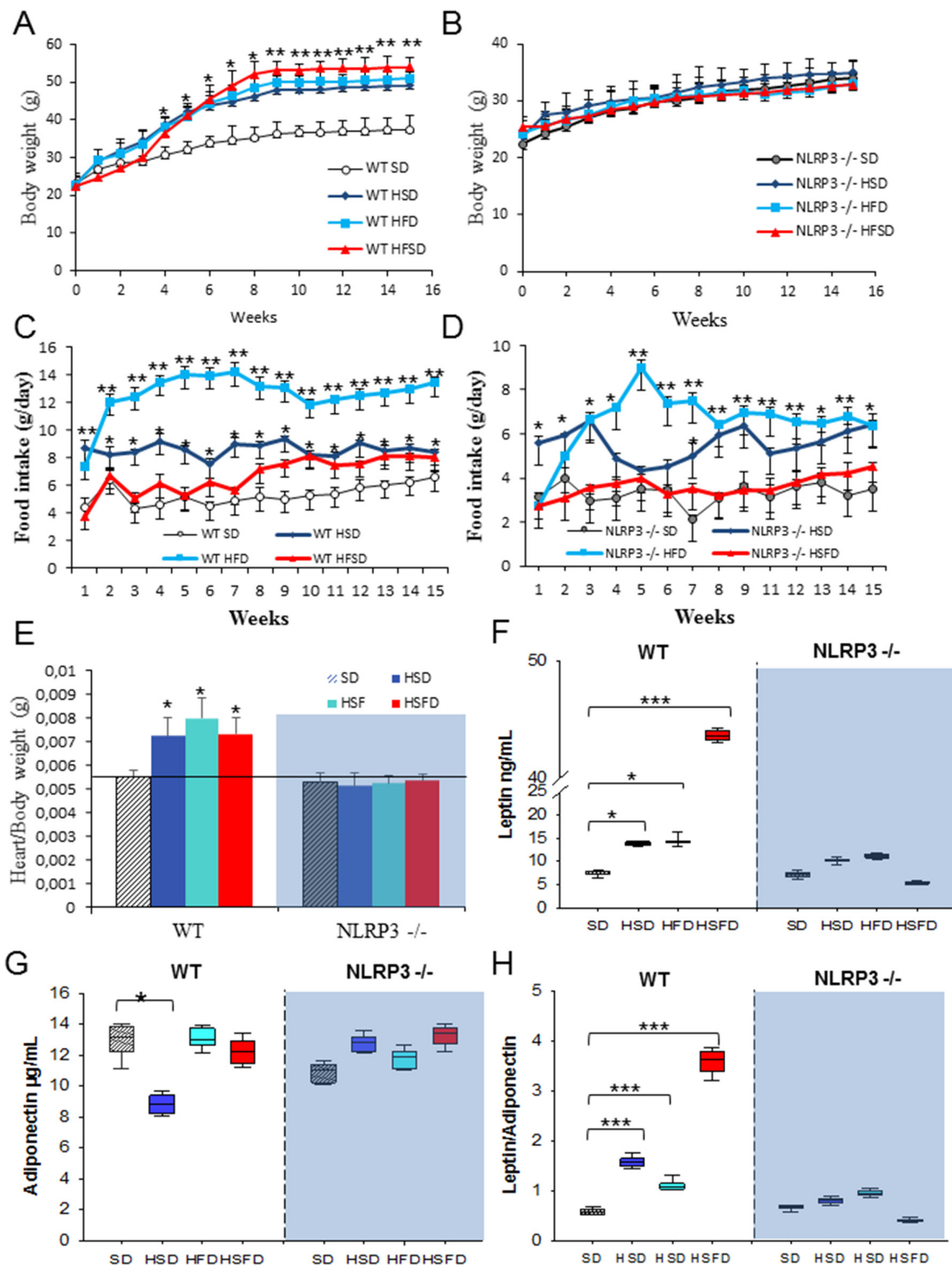
$-/-$  mice groups (Figures 1C and 1D). Predictably, hearts from WT mice were substantially heavier than SD-fed animals at the end of the study ( $p<0.05$ ) (Figure 1E and Supplementary Figure 1). This finding was not altered in the NLRP3  $-/-$  genotype on any obesity-associated diet.

In humans, high-caloric diets cause numerous alterations including increased glucose, cholesterol levels and leptin/adiponectin dysregulation leading to cardiovascular disease, metabolic syndrome, and non-alcoholic fatty liver disease [12, 13]. The HSD, HFD and HSFD-fed WT mice showed increased serum levels of leptin (HSD and HFD,  $p<0.05$ ; HSFD,  $p<0.001$ ) and leptin/adiponectin ratio ( $p<0.001$ ) (Figures 1F-1H), including abnormal serum levels of glucose, cholesterol, triglycerides, hepatic transaminases, uric acid and creatinine (Supplementary Table 2). These changes were not observed in NLRP3  $-/-$  mice.

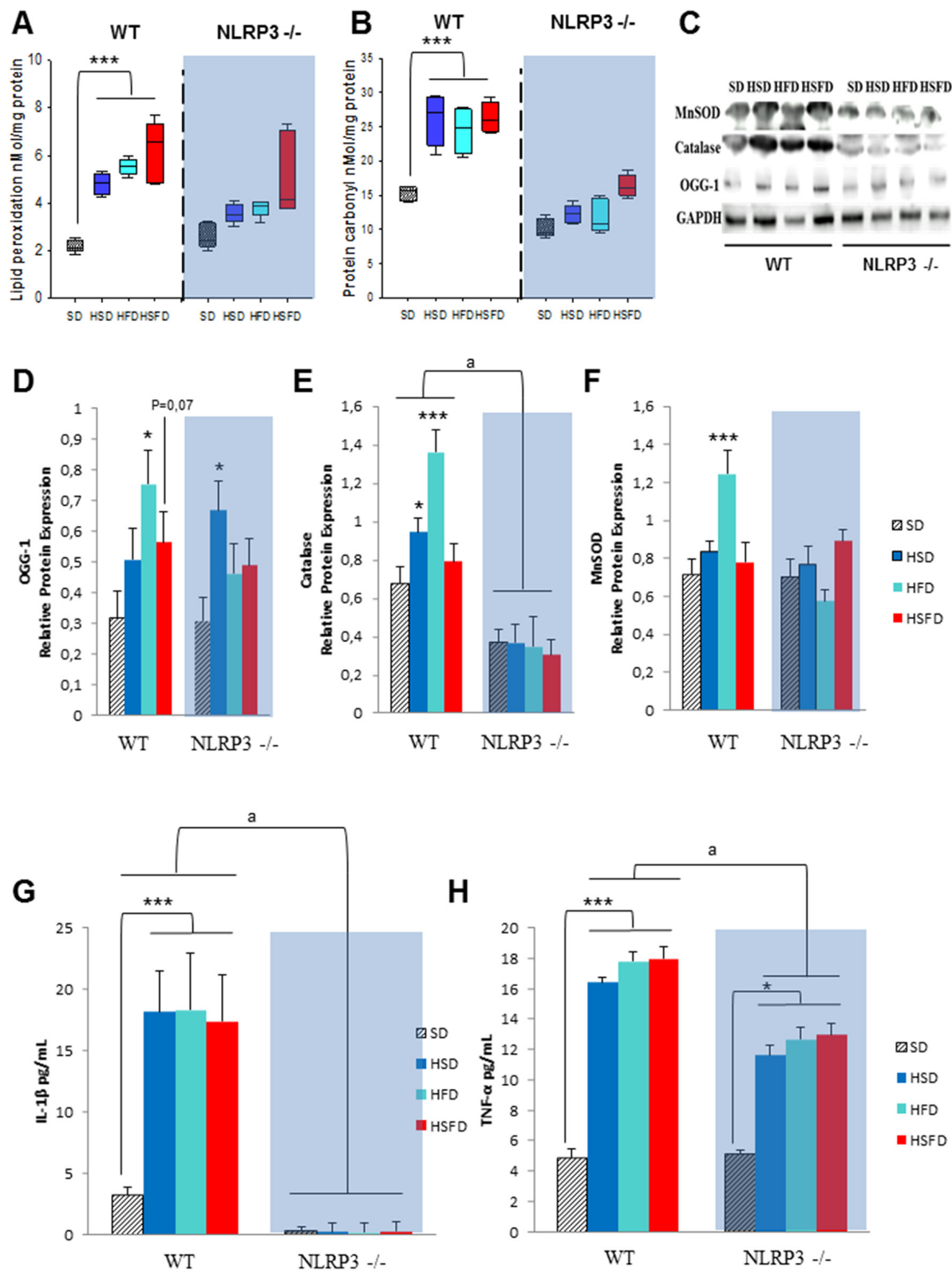
### NLRP3-deficiency induce a moderate protection against oxidative stress in heart and inflammation

Oxidative stress has an essential role in inflammasome activation [14], and has been implicated in the cardiac pathophysiology induced by obesogenic diets [15]. Accordingly, analysis of oxidative stress biomarkers in hearts of HSD, HFD and HSFD fed WT mice revealed significant increases in lipid peroxidation (Figure 2A), protein carbonyls (Figure 2B) and of 8-oxoguanine glycosylase (OGG1) (Figures 2C and 2D). Compared to WT mice, NLRP3  $-/-$  mice had a trend toward an elevated lipid peroxidation and OGG-1 levels (Figures 2A-2D). This finding was consistent with the antioxidant biomarkers were not increased in these knockout animals challenged with obesogenic diets, suggesting perhaps the absence of compensatory defense mechanisms (Figures 2E and 2F) in this genotype. These results were also accompanied by elevated serum inflammatory biomarkers such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in WT mice (Figures 2G and 2H). Interestingly, no differences in serum levels of IL-1 $\beta$  and a moderate increase in TNF- $\alpha$  were observed in all NLRP3  $-/-$  groups (Figures 2G and 2H).

Because high fat diet is also associated to cardiomyocyte apoptosis, which is coupled with oxidative stress and inflammation dysregulation [16], we determined several apoptotic biomarkers. Here HSD, HFD and HSFD feeding resulted in a significant increase in protein expression of cardiac BAX and active caspase 3 (Figures 3A, 3B and 3G) accompanied by reduced cardiac expression levels of antiapoptotic protein Bcl-2 (Figures 3C and 3G) in WT mice. NLRP3  $-/-$  mice showed reduced contents of apoptosis-related markers, consistent with the accumulation of Bcl-2 which stimulates antiapoptotic activity in heart (Figures 3C and 3G). Interestingly, these observations were also accompanied by increased SIRT1

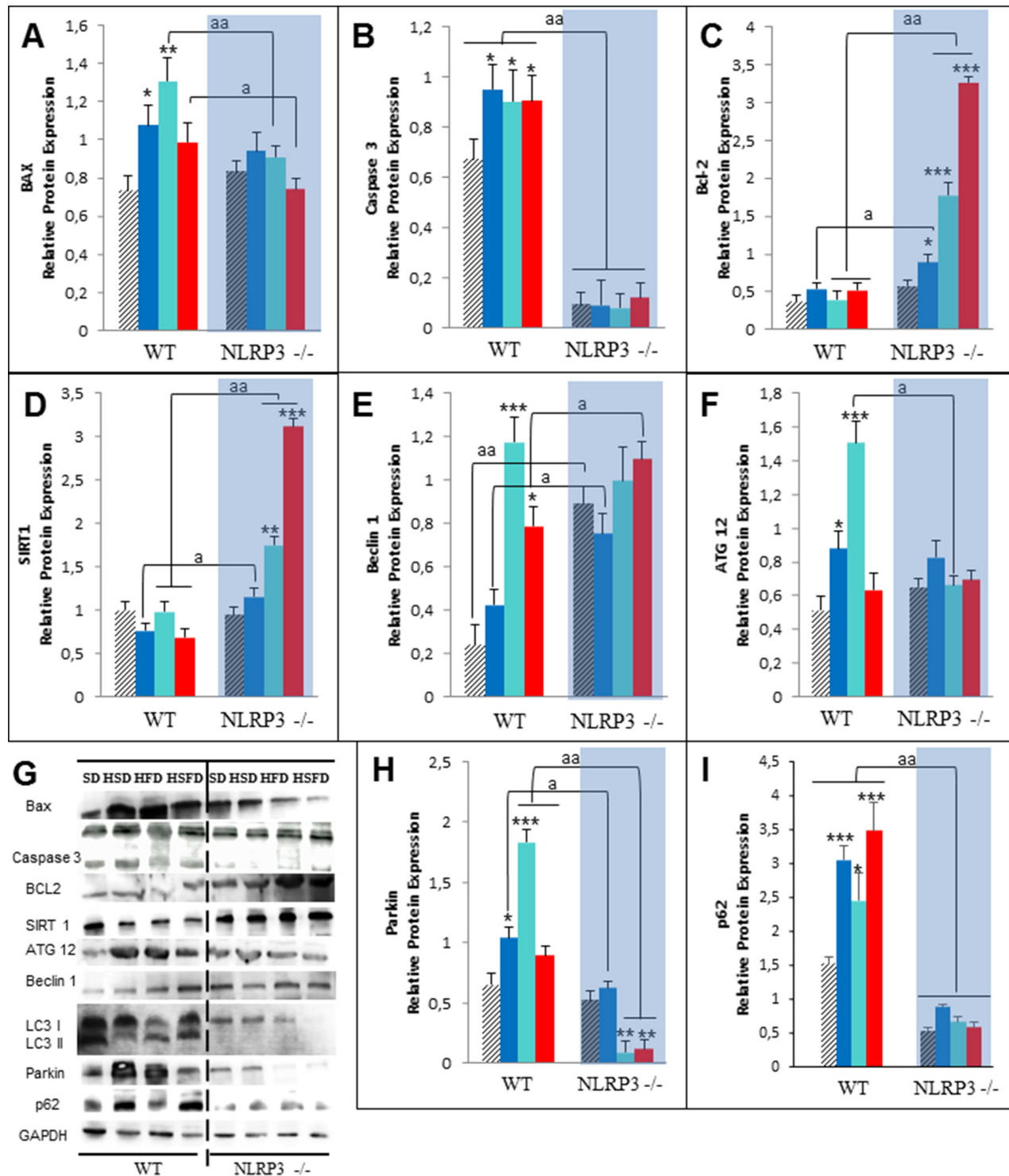


**Figure 1: Nlrp3 signaling suppression prevents obesity induced effects of the HSD, HFD and HSFD diets.** (A and B) Body weight chart of diets-induced obesity in WT and NLRP3<sup>-/-</sup> mice. The mice were fed with the diets for 15 weeks and their body weights were monitored weekly. (C and D) Average daily oral food intake normalized to body weight, measured on the different diets. The food intake of mice was measured was monitored weekly. (E) Heart weight normalized to body weight. (F-H) Levels of leptin, adiponectin, and ratio in plasma. Blood samples were collected after overnight fasting. All data are presented as means  $\pm$  SEM, n = 10 mice; \*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.001.



**Figure 2: Nlrp3 signaling elimination protects against oxidative and inflammatory effects of the HSD, HFD and HSFD diets. (A and B)** Levels of lipid peroxidation, and protein carbonyls in heart tissues from mice. **(C)** Protein expression level of 8-oxoguanine glycosylase (OGG-1), MnSOD and catalase. **(D-F)** Densitometric quantification of protein expression levels of western blots in heart tissues from mice relative to GAPDH (loading control). All data are presented as means  $\pm$  SEM with a representative blot,  $n = 6-10$  mice. **(G and H)** IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  levels in serum from WT and NLRP3<sup>-/-</sup> mice fed with the different diets were determined by ELISA. All data are presented as means  $\pm$  SEM with a representative blot,  $n = 10$  mice; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  HSD, HFD and HSFD vs SD; <sup>a</sup> $P < 0.005$  WT vs NLRP3<sup>-/-</sup>.





**Figure 3: Changes in apoptosis and autophagy in response to HSD, HFD and HSFD diets in WT and NLRP3<sup>-/-</sup> mice.** (A-C) Densitometric quantification of protein expression levels of Bax, Caspase 3 and Bcl-2 in heart tissues from mice relative to GAPDH (loading control). (D) Densitometric quantification of protein expression levels of Sirt1 in heart from mice. (E-F) Densitometric quantification of protein expression levels of autophagy markers in the heart. (G) Western blot analysis with representative blot including LC3. (H and I) Expression levels of Parkin and p62 level in the hearts of WT and NLRP3<sup>-/-</sup> mice. All data are presented as means  $\pm$  SEM, n = 6–8 mice; \*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.001 HSD, HFD and HSFD vs SD; <sup>a</sup>P < 0.005 WT vs NLRP3<sup>-/-</sup>.

protein expression levels in knockout mice (Figures 3D and 3G) which has a role in heart protection, for example, by anti-inflammatory and antioxidant effects [16].

### **NLRP3-deficient mice show an autophagic protection against HSD, HFD and HSFD-Induced heart damage**

One of the most important mechanisms in the cardiac protection/injury is autophagy, which is impaired during aging and diet-induced obesity, producing a less effective clearance process and contributing to important cardiac damage [17]. HSD, HFD and HSFD induced high expressions of two important autophagic proteins such as Beclin 1 and ATG-12 (Figures 3E, 3F and 3G) in WT animals. Furthermore, we observed an impaired autophagic flux determined by expression of LC3-II and increased expression of proteins involved in clearance pathways such as PARKIN and p62/SQSTM1 (Figures 3G, 3H and 3I). Interestingly, all NLRP3  $-/-$  groups showed an increased and more efficient autophagic machinery (Figures 3E-3I). As LC3-II overexpression can evoke either an increment of autophagy or an impairment of the autophagic flux, these LC3-II changes must to be interpreted together with the p62/SQSTM1 levels and minding that LC3-II itself is subject to autophagic degradation at the lysosome [18]. As, NLRP3  $-/-$  mice showed a more efficient autophagy induction, as the lower levels of LC3-II (Figure 3G) and the reduced levels of proteins such as parkin (Figure 3H) and p62/SQSTM1 (Figure 3I) is suggesting.

### **Changes in gene expression of adhesion molecules and fibrosis markers in heart**

To assess the impact of the diets on myocardial histology, cardiomyocyte cross-sectional area and fibrosis were examined. In the hematoxylin-and-eosin-stained sections, HSD and HFD but not HSFD showed a disarrangement of myofibrils and increased cardiomyocyte transverse cross-sectional area. However, NLRP3  $-/-$  groups only showed a moderate increase in HFD (Figures 4A, 4B and Supplementary Figure 2). Further examination with Masson trichrome staining revealed overt perivascular fibrosis after diets in WT group without significant changes in NLRP3  $-/-$  group (Figure 4A and Supplementary Figure 2). We also studied the changes in gene expression of several biomarkers of endothelial activation and fibrosis. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) were increased in heart tissues of HSD, HFD and HSFD-fed animals, but no significant changes were observed in NLRP3  $-/-$  animals exposed to the same diets (Figure 4D). Similarly, typical fibrosis biomarkers such as Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and fibronectin, were also increased in heart tissues of HSD, HFD and

HSFD-fed WT animals but again, nonoteworthy changes were observed in NLRP3  $-/-$  mice (Figure 4D). In the same line, apoptosis biomarker caspase 3 and endothelial inflammatory biomarker COX-2 were also increased in heart tissues of HSD, HFD and HSFD-fed animals but again, whilst no significative changes were observed in knockout animals (Figure 4D).

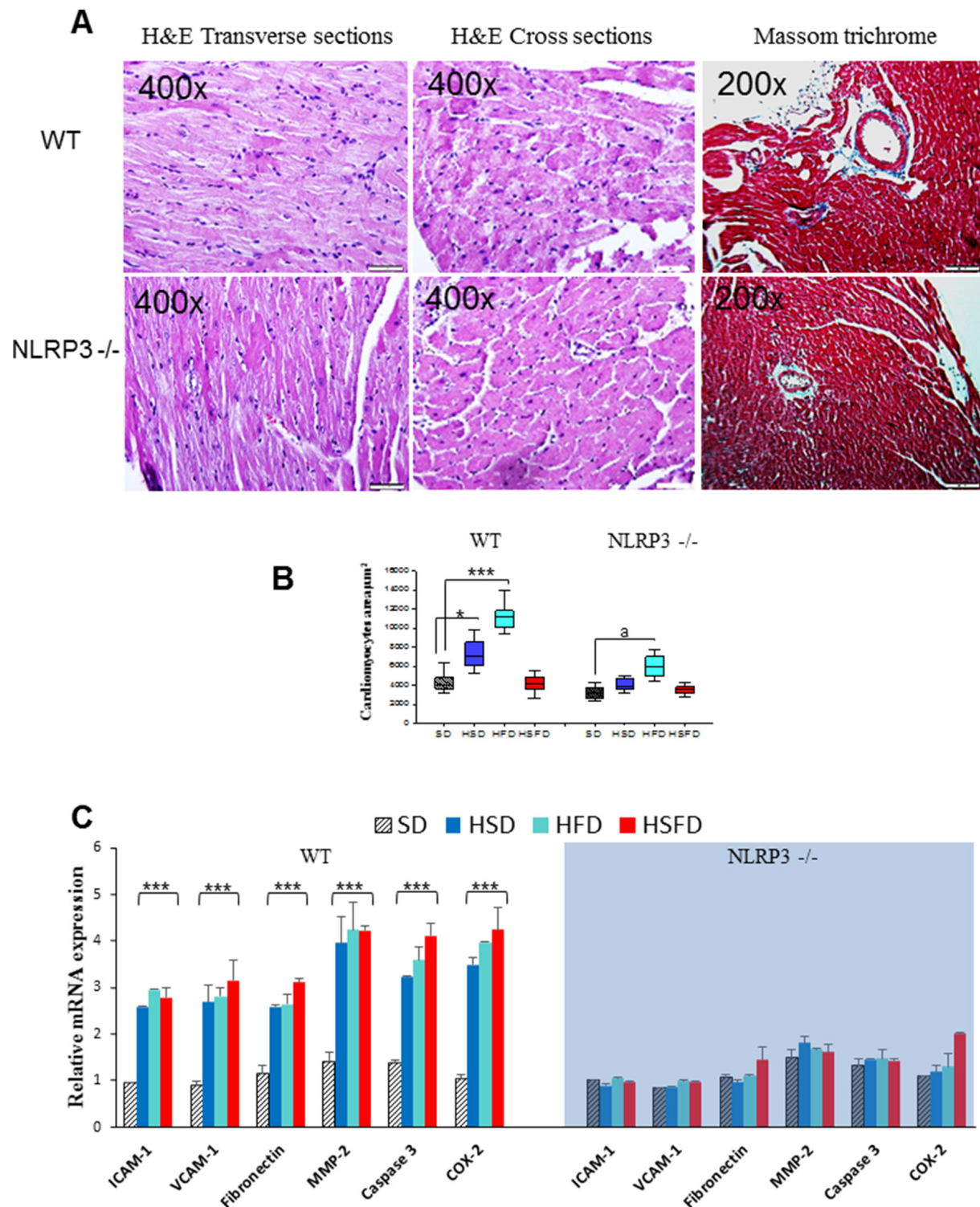
### **Pharmacological inhibition of NLRP3 prevent of the HSD, HFD and HSFD-Induced obesity and heart damage**

Using a pharmacological approximation, we have tested the effect of the same diets after inhibition of NLRP3 with MCC950. WT groups for this experiment were distributed in vehicle and the different diet+MCC950 (20 mg/Kg/day i.p.) animals. After fifteen weeks, all obesogenic diets led to increased weight in the vehicle group (Figure 5A), however the pharmacological inhibition of NLRP3- protected these animals from obesity (Figure 5A), similar to the genetic NLRP3 deletion. The daily food intake was lower in MCC950-treated groups compared to vehicle groups but, interestingly, with comparable relative changes among the different diets (Figure 5B). The different diets were shown to increase the heart weight in vehicle groups (Figure 5C and Supplementary Figure 3), with no change after MCC950 administration. Furthermore, MCC950 reduced cardiomyocytes area and perivascular fibrosis induced by diets (Supplementary Figure 4).

The metabolic studies performed with these groups of animal showed how the treatment with the MCC950 inhibitor ameliorated the effect on several circulating metabolites. Thus, the increased leptin and leptin/adiponectin ratio observed after HSD, HFD and HSFD feeding in vehicle groups, was reduced in the MCC950-treated groups with elevated adiponectin levels (Figures 5D-5F). Similarly, some alterations of biomarker levels in serum including glucose, cholesterol, triglycerides, hepatic transaminases, uric acid and creatinine (Supplementary Table 3) were reverted in the MCC950-treated mice.

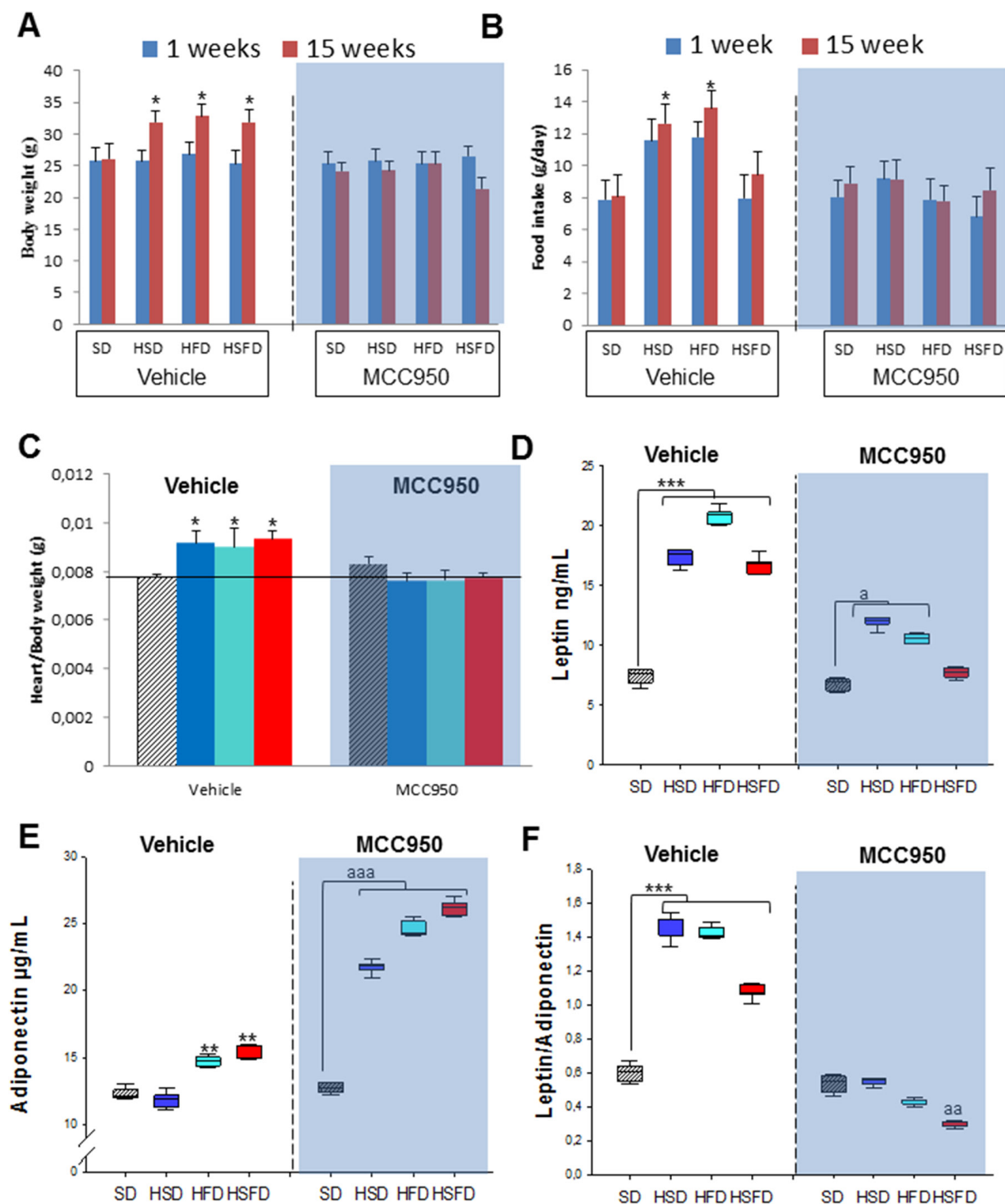
Guided by these findings on several metabolic pathways, we examined the effect of the obesogenic diets on oxidative stress, apoptosis and autophagy in heart tissues and compared to the observations described with NLRP3  $-/-$  mice. As expected, we observed that the inhibitor resulted in a significant reduction of lipid peroxidation compared to those in the HSD, HFD and HSFD-vehicle groups together with a reduction of MnSOD protein expression (Figures 6A-6C). Additionally, MCC950 also induced down-regulation of the active caspase 3 apoptotic protein (Figures 6B and 6D).

We also observed the same protective mechanisms in cardiac tissues determined by the high overexpression levels of SIRT1 in heart tissues of MCC950 treated groups (Figures 6B and 6E). Consistent with the NLRP3

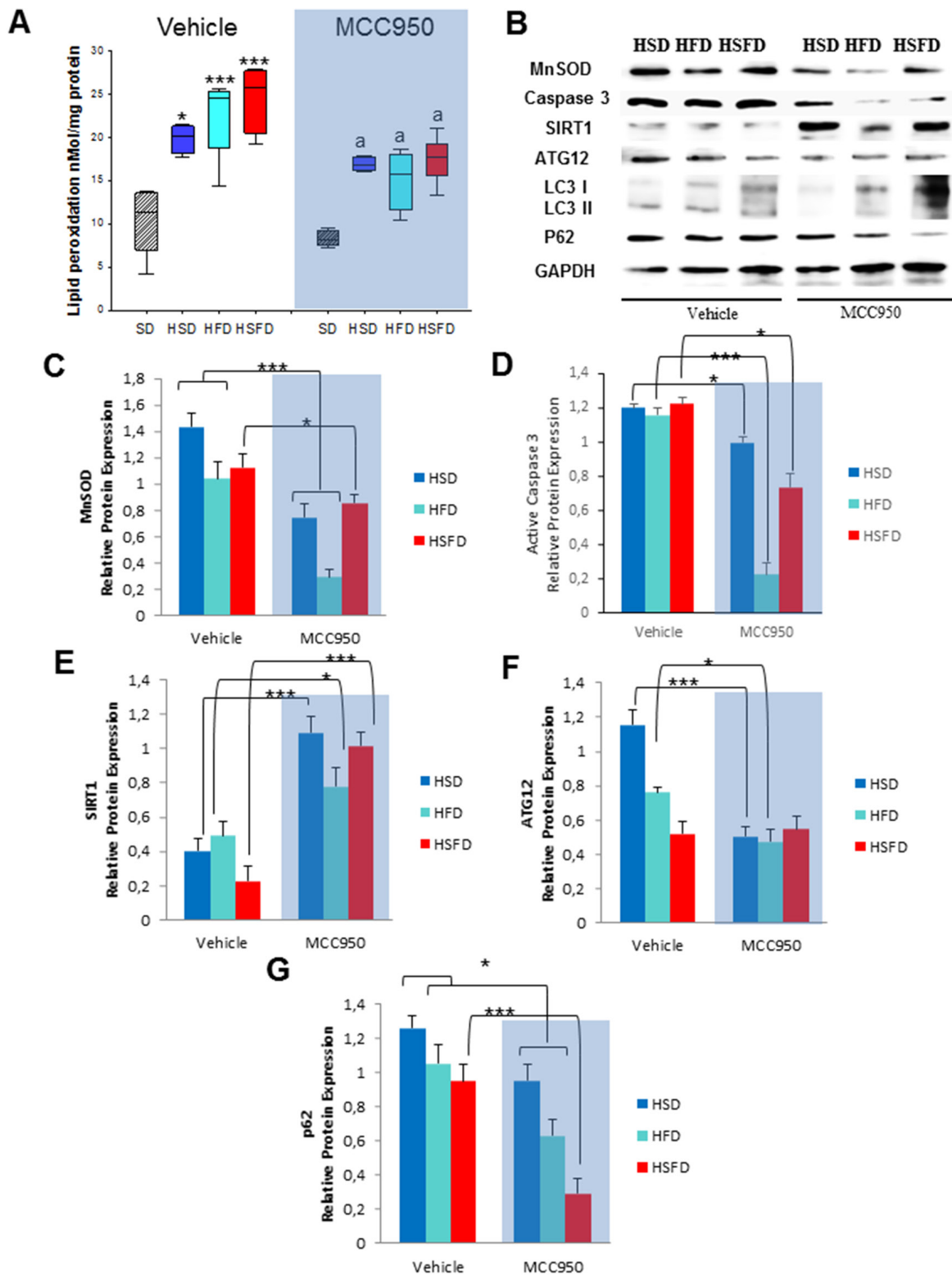


**Figure 4: Histological analyses and gene expression changes of adhesion molecules and fibrosis markers in heart.** (A) Representative hematoxylin-and-eosin-stained micrographs showing transverse sections of Left Ventricular (LV) myocardium, cross-sectional area and representative Masson trichrome-stained micrographs showing perivascular sections of myocardium of HFD from WT and NLRP3<sup>-/-</sup>. Complete diets see Supplementary figure 2. (B) Quantitative analysis of cardiomyocyte cross-sectional (transverse) area with measurements of  $\approx 100$  cardiomyocytes from 3 to 6 mice per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$  HSD, HFD and HSFD vs SD. (C) Relative gene expressions of ICAM-1 and VCAM-1 (mean  $\pm$  SEM) determined by quantitative PCR in heart from WT and NLRP3<sup>-/-</sup>. Relative gene expressions of MMP-2, and fibronectin and relative gene expressions of Caspase 3 and COX-2 determined by quantitative PCR in heart from WT and NLRP3<sup>-/-</sup>. All data are presented as means  $\pm$  SEM,  $n = 6$  mice; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.001$  HSD, HFD and HSFD vs SD.





**Figure 5: NLRP3 inhibition by MCC950 prevents obesity induced effects of the HSD, HFD and HSFD diets.** (A) Body weight chart of diets-induced obesity in WT-vehicle and MCC950 mice fed with HSD, HFD and HSFD diets. The mice were fed with the diets for 15 weeks and their body weights were monitored weekly. We represent the changes of the final week respect to the first week. (B) Average daily oral food intake normalized to body weight, measured on the different diets. The food intake of mice was measured weekly. We represent the changes of the final week respect to the first week. (C) Heart weight normalized to body weight. (D-F) Levels of leptin, adiponectin, and ratio in plasma. Blood samples were collected after overnight fasting. All data are presented as means  $\pm$  SEM, n = 10 mice; \*P < 0.05, \*\*\*P < 0.005 HSD, HFD and HSFD vs SD; <sup>a</sup>P < 0.05, <sup>aa</sup>P < 0.005 MCC950 vs vehicle.



**Figure 6: Changes in oxidative stress, apoptosis and autophagy in response to MCC950.** (A) Lipid peroxidations. (B) Protein expression levels by western blot of MnSOD antioxidants in heart after MCC950 treatment in mice. We compare HSD, HFD and HSFD diets with MCC950 treated groups. (C) Densitometric quantification of protein expression levels of the antioxidant in heart tissues from mice relative to GAPDH (loading control). (D) Densitometric quantification of protein expression levels of the active Caspase 3 protein. (E) Densitometric quantification of protein expression levels of Sirt1 in heart from mice. (F and G) Densitometric quantification of protein expression levels of autophagy markers ATG12 and p62 in the heart in the hearts after diets and MCC950 treatment. All data are presented as means  $\pm$  SEM with a representative blot,  $n = 4-5$  mice; \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  MCC950 vs vehicle.

-/- protective phenotype, we observed an increase of ATG12 and LC3II protein expression after diets with a p62/SQSTM1 accumulation, which were restored after treatment with MCC950 (Figures 6B, 6F and 6G). This autophagy induction was also demonstrated in an *in vitro* experiment. THP-1 cells treated with this inhibitor showed similar induction of autophagy as with rapamycin with an improved autophagic flux (Supplementary Figure 5). MCC950 also reduced serum biomarkers of inflammation such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  associated with the different diets (Supplementary Figure 6).

### Serum from HSD, HFD and HSFD-fed mice induce inflammasome and inflammation activation in monocytes

It is known that some soluble circulating factors can induce cardiac damage and systemic inflammation [19]. We next sought to investigate if serum separated from these mice are able to induce these alterations in cultured cells. Since the diets induced increased released levels of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum, an inflammatory phenotype could be induced in cells. THP-1 monocytes were incubated for 24 hr with media containing serum from mice fed with either SD, HSD, HFS, and HSFD diets for 15 weeks and the inflammatory profiles were determined. Our results indicate that incubation with these sera show an increase in inflammasome gene expression NLRP3 ( $p < 0.01$ ) and IL-1 $\beta$  ( $p < 0.01$ ) (Figure 7A and 7B) and other inflammatory genes such as TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ) and IL-6 ( $p < 0.01$ ) (Figures 7C and 7D, which were accompanied by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  medium release (Figures 7E and 7F). Interestingly, the incubation with media containing different sera from mice fed with SD, HSD, HFS, and HSFD diets and treated with MCC950 showed a reduction in inflammasome ( $p < 0.01$ ) (Figures 8A and 8B) and other inflammatory genes expression ( $p < 0.01$ ) (Figures 8C and 8D). This may be due to the high protein binding of MCC950 (a sulfonyl urea), which results in a significant amount of drug in serum, being available for release in the *in vitro* assay.

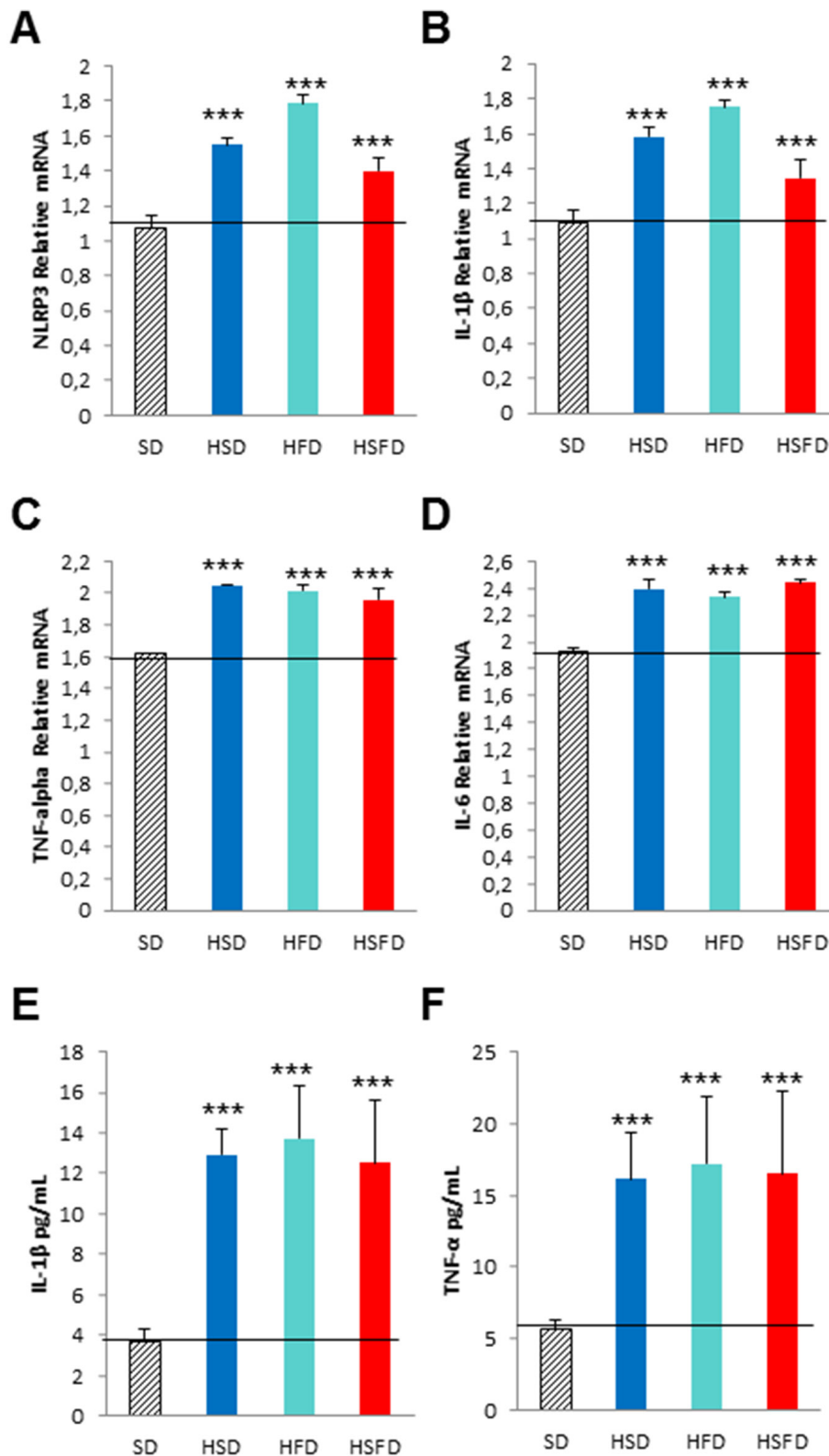
## DISCUSSION

It has been shown that chronic over-nutrition: i) can induce inflammasome activation in several metabolic tissues such as adipose, renal and hepatic tissues [7–9], ii) can activate the NLRP3-inflammasome in macrophages [20], iii) has been involved in obesity-induced inflammation and insulin resistance [21], and iv) can initiate intestinal inflammation in epithelial cells [22]. In this context, activation of NLRP3 inflammasome mediating IL-1 $\beta$  and IL-18 secretion has emerged as an important component of inflammatory processes in cardiovascular diseases [23, 24]. Our findings provide interesting data of how these obesogenic diets promote

the activation of NLRP3-inflammasome in the heart. The HSD, HFD and HSFD feeding induced not only an important increment in body and heart weights, but also an increment in several important cardiovascular risk biomarkers such as high levels of leptin and leptin/adiponectin ratio [25] as well as alterations in several biochemical parameters and tissue damage biomarkers. These diets also induced cardiac damage by increased oxidative stress, inflammation, apoptosis and an impaired autophagy process. Corroborating existing literature, all these physical and metabolic alterations have been observed in HFD and HSD, and both have been closely linked to an increased obesity risk, cardiac disease, diabetes (T2D), metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease [26].

Autophagy is a critical mechanism to preserve cellular homeostasis and has been implicated in the maintenance of cardiac structure and function under physiological and/or pathological conditions. Different studies have demonstrated an indispensable role of this process in the etiology of cardiac anomalies under obesity and metabolic syndrome [27]. In fact, obesity induced by HFD showed an impaired autophagic flux in heart tissue<sup>28</sup> similar to our observations. A high-carbohydrate (fructose) has also been shown to induce the same modifications in hepatic tissues [29], which could corroborate our observations in heart induced by all high caloric diets. Obesity is recognized as a chronic, low-grade, systemic inflammation, which contributes to the development of several metabolic and cardiovascular diseases [4]. The fact that these observed effects were partially reproduced in THP-1 monocytes incubated with media supplemented with serum from mice fed HSD, HFS or HSFD suggest systemic effects of high glucose, cholesterol or other serum factors with potential interest to the development of these metabolic and inflammatory adaptation, and autophagic impairment.

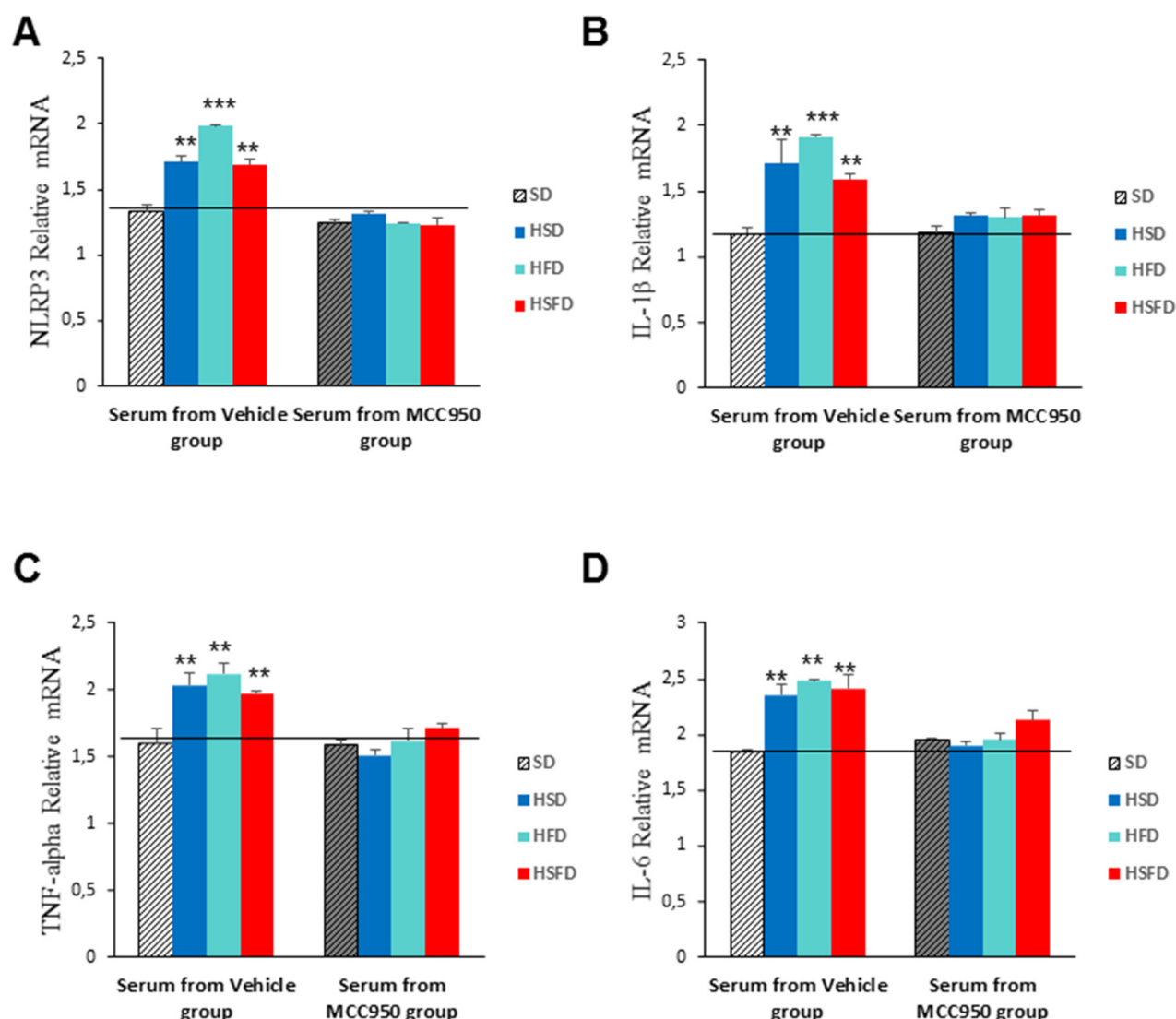
The role of NLRP3-inflammasome in the HFD-induced and obesity-related cardiovascular disease has been poorly studied. However, NLRP3 in subcutaneous adipose tissue has been associated with the severity of coronary atherosclerosis [30]. A recent study has shown genetic variants of NLRP3 in the pathogenesis of atherosclerosis [31], and NLRP3 and inflammatory cytokines have also been proposed as new cardiovascular risk biomarkers [32]. Taken together, these data suggest that the inhibition of inflammasome complex could help to protect the progression of many metabolic and cardiovascular diseases. Our results demonstrate that the NLRP3 deficient mice are protected from HSD, HFD and HSFD-associated body-weight gain, left ventricle hypertrophy and increased myocardial mass and related cardiomyopathies, and the disappearance of different cardiac remodeling-related dysfunctions and the absence of alterations in key biochemical biomarkers. All these observations are in concordance with previous



**Figure 7: Pro-inflammasome and pro-inflammation effects in THP-1 monocytes cultivated with different sera from WT mice fed with HSD, HFD and HSFD diets.** (A and B) Relative gene expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$  determined by quantitative PCR in THP-1 cells. (C and D) Relative gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 determined by quantitative PCR in THP-1 cells. (E and F) IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  medium release from THP-1 cells. THP-1 monocytes were assessed after a 24 hr incubation with media containing serum from mice fed with SD, HSD, HFD, and HSFD diets for 15 weeks. The graphs show the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. \*\*\*P < 0.01.

observations on the protective effect of inflammasome complex in mice and reducing HFD pathological effects [7-9, 20, 21]. However, similarly to previous studies [7, 33], increased leptin levels in NLRP3 deficient mice was similar to WT mice on HSD and HFD, whereas NLRP3 knockout mice did not show changes in cardioprotective adiponectin levels [34]. NLRP3 deletion also showed a moderate but not significant oxidative stress increase, which was not enough to induce antioxidants synthesis in these animals. These results were accompanied by increased levels of pro-inflammatory TNF- $\alpha$  but not the IL-1 $\beta$  in WT animals in obesogenic diets. However, NLRP3  $-/-$  mice showed attenuated increases in pro-inflammatory mediators, strengthening the idea

that these knockout animals are more protected from damages induced by these diets. These observations were accompanied by reduced apoptosis induction in NLRP3  $-/-$  mice with increased expression of the anti-apoptotic Bcl-2 and Sirt1, a NAD $^{+}$ -dependent class III histone deacetylase, which has been shown to protect from endothelial dysfunction, atherothrombosis, diet-induced obesity, type 2 diabetes, liver steatosis, and myocardial infarction [35]. In this sense, NLRP3  $-/-$  mice showed no modifications in gene expression of potential vascular dysfunction and regulators of fibrosis induced in heart tissues by the diets. Interestingly, very recent and elegant studies have shown that mice deficient in inflammasome components are resistant to endothelial dysfunction and



**Figure 8: Inflammasome inhibition in THP-1 monocytes cultivated with sera from MCC950-treated WT mice fed with HSD, HFD and HSFD diets.** (A and B) Relative gene expression of NLRP3 and IL-1 $\beta$  determined by quantitative PCR in THP-1 cells. (C and D) Relative gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 determined by quantitative PCR in THP-1 cells. THP-1 monocytes were assessed after a 24 hr incubation with media containing serum from mice fed with SD, HSD, HFS, and HSFD diets and mice fed with SD, HSD, HFS, and HSFD and treated with MCC950 for 15 weeks. The graphs show the mean  $\pm$  SEM from three independent experiments. \*P < 0.05, \*\*P < 0.005, \*\*\*P < 0.001.



fibrosis induced by different challenges in liver, lung or kidney, similar to our observations in the heart [36–38]. In mammalian cells, Sirt1 modulate distinct metabolic and stress-response pathways including autophagy [39] so, the increased expression of this protein in NLRP3  $-/-$  mice could improve the capacity for metabolic adaptation and/or cardiovascular protection. Likewise, NLRP3  $-/-$  mice showed a very efficient autophagy flux. Collectively, all these studies and the recent findings that these mice have also efficient autophagy flux in lung tissues and improved resistance to hyperoxia [40] indicate that NLRP3 deficiency remarkably protect different organs from stress situations, such as the obesogenic diets.

Further, the inhibition of inflammasome activation recently been shown to induce an important protective effect in cardiac injury. Abderrazak et al., (2016) showed an inhibition of NLRP3-inflammasome and autophagy induction in ApoE2. Ki mice in high-fat diet after treatment with a natural product called arglabin [41]. Other novel inhibitor named as 16673-34-0, an intermediate substrate of the synthesis of glyburide free of the cyclohexylurea moiety, has a potent inhibitory effect limiting the secondary inflammatory response and reducing infarct size in a mouse model of acute myocardial ischemia-reperfusion injury [42]. More recently, MCC950 has been shown to reduce the infarct size and preserves cardiac function in a randomized, blinded translational large animal myocardial infarction model [43]. In our study, we have studied for the first time the protective effect of the same selective inhibitor, on cardiac tissues induced by obesogenic diets. We showed that daily intraperitoneal administration of MCC950 prevent from HSD, HFD and HSFD-associated body-weight gain, heart-weight gain, increased circulating adiponectin, and maintained leptin and leptin/adiponectin levels, in line with this protection role. Our study also reveals that other circulating markers of tissue damage and inflammation were reduced in animals treated with MCC950. Furthermore, results in MCC950 treated mice reproduced previous observations with NLRP3  $-/-$  mice under oxidative stress displayed reduced apoptosis and induced Sirt1 expression accompanied by an improved autophagy flux in heart tissues. Finally, previous *in vitro* studies have shown a reduction of inflammation in cells treated with serum from HFD+Resveratrol fed animals because of anti-inflammatory effect and overexpression of Sirt1 induced by this compound [13, 44]. In line with these studies, we observed that THP-1 monocytes treated with media supplemented with serum from mice fed with HSD, HFD or HSFD+MCC950 diets had lower mRNA expression of the inflammasome (NLRP3 and IL-1 $\beta$ ) and inflammation (TNF- $\alpha$  and IL-6) components when compared to the chronic overfeeding animals. Taken together, these data indicate that monocytes could contribute, at least in part, to the beneficial effects of MCC950 in systemic inflammation.

In conclusion, our data suggests that the inhibition of NLRP3-inflammasome produces beneficial metabolic, inflammatory and could induce an autophagic adaptations in the heart of diet-induced obesity mice models. In addition, it is possible that monocytes could participate in the heart damage induced by systemic inflammation after chronic exposure to unhealthy diets. Although lifestyle changes are the primary interventions to prevent obesity and consequent heart failures associated to obesogenic diets, the damages occasioned in cardiac tissues after prolonged unhealthy habits can be irreversible. In these cases, the use of inflammasome inhibitors such as MCC950, with a potential autophagic adaptation of the tissues, may hold a promise as therapy to ameliorate heart damage and metabolic changes, which accelerates CVD.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethical statements

Animal studies were performed in accordance with the European Union guidelines (2010/63/EU) and the corresponding Spanish regulations for the use of laboratory animals in chronic experiments (RD 53/2013 on the care of experimental animals). All experiments were approved by the local institutional animal care committee.

### Animals

For all experiments, only male mice were used. C57/BL6/J mice and NLRP3 $-/-$  transgenic mice (C57BL/6J background), weighing 25-30 g were maintained on a regular 12 h light/dark cycle. Diets were started at 16 weeks of age after randomization into four groups. These groups correspond to the following dietary regimens: i) regular chow or standard diet (SD) from Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet, Harlan Laboratories (carbohydrate:protein:fat ratio of 48:14:4 percent of kcal); ii) a HFD consisting of Teklad Global modified to provide 45% of calories from fat; iii) a high sugar diet consisting of Teklad Global modified to provide 32% of calories from sucrose and a HSFD with the combination of fat and sucrose. MCC950 was included in different groups with the same diets in daily doses of 20 mg/kg (drug/kg body weight). All groups had ad libitum access to their prescribed diet and water throughout the study. Body weight and food intake were monitored weekly. Animal rooms were maintained at 20–22°C with 30–70% relative.

### Reagents

Monoclonal antibodies specific for Beclin-1 and p62 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA). Anti-GAPDH monoclonal antibody was acquired from Calbiochem-Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, UK). Similarly, anti-NLRP3 antibody was purchased from

Adipogen (San Diego, USA); while anti-active caspase-3, anti-SIRT-1 and anti-Parkin were obtained from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). Finally, anti-IL-1 $\beta$  (p17), anti-OGG-1, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-MnSOD, anti-catalase, anti-ATG12 and anti-MAP-LC3 antibodies from (Santa Cruz Biotechnology). A cocktail of protease inhibitors (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail) was purchased from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). The Immun Star HRP substrate kit was obtained from Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, CA).

### ***In vitro* cell experiments**

THP-1 cells, a human leukemia monocytic cell line extensively used to study monocyte/macrophage functions, were cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in RPMI-1640 medium supplemented with L-glutamine, an antibiotic/antimycotic solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), and 10% fetal bovine serum. THP-1 cells were incubated for 24 hr with media containing serum from mice under SD, HSD, HFD and HSFD diets.

### **IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ levels**

Serum or culture medium levels of IL-1 $\beta$  (GenWay, San Diego CA, USA) and TNF- $\alpha$  (Biosource, UK, and GenWay, San Diego, USA) were assayed in duplicate using commercial ELISA kits.

### **Leptin and adiponectin**

Serum levels of leptin and adiponectin were assayed in duplicate using commercial ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, USA).

### **Serum biomarkers**

Serum levels of glucose, triglycerides, cholesterol, uric acid, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and creatine kinase were assayed using commercial kits (Randox Laboratories, Antrim, UK).

### **Immunoblotting**

Western blotting was performed using standard methods. After protein transfer, the membrane was incubated with various primary antibodies diluted 1:1000, and then with the corresponding secondary antibody coupled to horseradish peroxidase at a 1:10000 dilution. Specific protein complexes were identified using the Immun Star HRP substrate kit (Biorad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA).

### **Lipid hydroperoxides**

The FOX assay was carried out according to the method previously reported [45]. The FOX reagent

was prepared by mixing in the order: 90 ml methanol, 88 mg BHT, 10 ml 250 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 9.8 mg ammonium ferrous sulfate hexahydrate and 7.6 mg xylenol Orange. 680  $\mu$ l of FOX reagent were added to 320  $\mu$ l of each sample, and the solution was incubated for 30 min at 37 °C with gentle shaking. After a short high-speed centrifugation (3,000 $\times$ g for 1 min at room temperature), samples absorbance was read at 560 nm against the blank (0.9% NaCl and FOX reagent). For hydroperoxides quantification, a serial standard dilution of hydrogen peroxide was used.

### **Protein carbonyl**

Protein carbonyls were assayed in duplicates by commercial ELISA kits using a commercial kit from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA).

### **Histological study**

After anesthesia of mice, hearts were excised and immediately placed in a 10% neutral-buffered formalin at room temperature for 24 hours after a brief rinse with PBS. The specimens were embedded in paraffin, cut in 5- $\mu$ m sections, and stained with hematoxylin and eosin. Cardiomyocyte cross-sectional areas were calculated on a digital microscope ( $\times$ 400) with ImageJ (version 1.34S) software. Masson's trichrome staining was used to detect fibrosis in heart sections and fibrotic areas were also calculated on a digital microscope ( $\times$ 400) with ImageJ (version 1.34S) software.

### **Real-time quantitative PCR**

The expression of NLRP3 gene was analyzed by SYBR Green quantitative PCR of mRNA extracted from cardiac tissues. Total cellular RNA was purified from the cells using the Trisure method (Bioline, London, UK). RNA concentration was determined spectrophotometrically. Contaminating genomic DNA was removed by incubation of one microgram of total RNA from each sample with gDNA wipeout buffer (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen. Hilden, Germany) for 5 min at 42°C. RNA samples were subsequently retrotranscribed to cDNA using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen. Hilden, Germany). Thermal cycling conditions used were denaturation at 95°C for 20 s, 40 cycles of priming at 54°C for 20 s, and elongation at 72°C for 20 s. Primers used can be consulted in Supplementary Table 1. All reactions were performed in duplicate. Reaction mixtures, without RNA, were used as negative controls in each run. Absence of genomic DNA contamination was confirmed by setting up control reactions that do not contain reverse transcriptase. Fold changes in the expression of genes of interest were calculated using the  $\Delta\Delta$ Ct method.

## Statistics

All data are expressed as means  $\pm$  SEM. After, evaluation of normality using Shapiro-Wilk test, statistical differences among the different groups were measured using either an unpaired Student t test or 1-way analysis of variance (ANOVA) when appropriate with Tukeys post-hoc test. A P value of  $\leq 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Prism software version 5.0a (GraphPad, San Diego, CA). Asterisks in the figures represent the following: \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; and \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

## Abbreviations

8-oxoG: 7,8-dihydro-8-oxoguanine; CVD: Cardiovascular disease; HFD: High fat diet; HSD: High sugar diet; HSFD: High sugar and fat diet; IL-(1 $\beta$ ,18): interleukins; NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; OGG-1: 8-oxoguanine glycosylase.

## Author contributions

MDC, JRC, JLQ and PB designed research studies. LPR, DCL, EAG, FMA, and SP conducted experiments and acquired data. AAR and MAC generated and provided reagents. JM, BR, PB, JRC and MDC wrote and edited the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from the Andalusian regional government (Grupo de Investigacion Junta de Andalucía CTS113), Consejería de Salud de la Junta de Andalucía: PI-0036-2014.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare have no conflicts of interests

## REFERENCES

1. Gómez-Pardo E, Fernández-Alvira JM, Vilanova M, Haro D, Martínez R, Carvajal I, Carral V, Rodríguez C, de Miguel M, Bodega P, Santos-Beneit G, Peñalvo JL, Marina I, Pérez-Farinós N, Dal Re M, Villar C, Robledo T, Vedanthan R, Bansilal S, Fuster V. A Comprehensive Lifestyle Peer Group-Based Intervention on Cardiovascular Risk Factors: The Randomized Controlled Fifty-Fifty Program. *J Am Coll Cardiol*. 2016; 67:476-85.
2. Ford ES, Li C, Zhao G, Pearson WS, Capewell S. Trends in the prevalence of low risk factor burden for cardiovascular disease among United States adults. *Circulation* 2009; 120:1181-08.
3. Graciani A, León-Muñoz LM, Guallar-Castillón P, Rodríguez-Artalejo F, Banegas JR. Cardiovascular health in a southern Mediterranean European country: a nationwide population-based study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2013; 6:90-8.
4. Minihiene AM, Vinoy S, Russell WR, Baka A, Roche HM, Tuohy KM, Teeling JL, Blaak EE, Fenech M, Vauzour D, McArdle HJ, Kremer BH, Sterkman L, Vafeiadou K, Benedetti MM, Williams CM, Calder PC. Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br J Nutr*. 2015; 114:999-1012.
5. Youm YH, Grant RW, McCabe LR, Albarado DC, Nguyen KY, Ravussin A, Pistell P, Newman S, Carter R, Laque A, Münzberg H, Rosen CJ, Ingram DK, Salbaum JM, Dixit VD. Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell Metab*. 2013; 18:519-32.
6. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-beta. *Mol Cell*. 2002; 10:417-26.
7. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, Neale GA, Hooiveld GJ, Hijmans A, Vroegrijk I, van den Berg S, Romijn J, Rensen PC, Joosten LA, Netea MG, Kanneganti TD. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:15324-9.
8. Chiazza F, Couturier-Maillard A, Benetti E, Mastrocola R, Nigro D, Cutrin JC, Serpe L, Aragno M, Fantozzi R, Ryffel B, Thiemermann C, Collino M. Targeting the NLRP3 inflammasome to reduce diet-induced metabolic abnormalities in mice. *Mol Med*. 2015; <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00104>.
9. Boini KM, Xia M, Koka S, Gehr TW, Li PL. Instigation of NLRP3 inflammasome activation and glomerular injury in mice on the high fat diet: role of acid sphingomyelinase gene. *Oncotarget*. 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8023>.
10. Mastrocola R, Collino M, Penna C, Nigro D, Chiazza F, Fracasso V, Tullio F, Alloati G, Pagliaro P, Aragno M. Maladaptive Modulations of NLRP3 Inflammasome and Cardioprotective Pathways Are Involved in Diet-Induced Exacerbation of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:3480637.
11. Luo B, Li B, Wang W, Liu X, Xia Y, Zhang C, Zhang M, Zhang Y, An F. NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. *PLoS One*. 2014; 9:e104771.
12. DiNicolantonio JJ, Lucan SC, O'Keefe JH. The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2016; 58:464-72.
13. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. Resveratrol improves health



- and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006; 444:337-42.
14. Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, Rouis M. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol*. 2015; 4:296-307.
  15. Ballal K, Wilson CR, Harmancey R, Taegtmeyer H. Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. *Mol Cell Biochem*. 2010; 344:221-30.
  16. Hsu HC, Chen CY, Lee BC, Chen MF. High-fat diet induces cardiomyocyte apoptosis via the inhibition of autophagy. *Eur J Nutr*. 2016; 55:2245-54.
  17. Linton PJ, Gurney M, Sengstock D, Mentzer RM Jr, Gottlieb RA. This old heart: Cardiac aging and autophagy. *J Mol Cell Cardiol*. 2015; 83:44-54.
  18. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, et al, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition), *Autophagy*. 2016; 12:1-222.
  19. Libby P, Nahrendorf M, Swirski FK. Leukocytes Link Local and Systemic Inflammation in Ischemic Cardiovascular Disease: An Expanded "Cardiovascular Continuum". *J Am Coll Cardiol*. 2016; 67:1091-103.
  20. Wen H, Gris D, Lei Y, Jha S, Zhang L, Huang MT, Brickey WJ, Ting JP. Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat Immunol*. 2011; 12:408-15.
  21. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011; 17:179-88.
  22. Progetzky F, Sangha NJ, Yoshida N, McBrien M, Cheung J, Shia A, Scott J, Marchesi JR, Lamb JR, Bugeon L, Dallman MJ. Dietary cholesterol directly induces acute inflammasome-dependent intestinal inflammation. *Nat Commun*. 2014; 5:5864.
  23. Grundmann S, Bode C, Moser M. Inflammasome activation in reperfusion injury: Friendly fire on myocardial infarction? *Circulation*. 2011; 123:574-576.
  24. Takahashi M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction. *Int Heart J*. 2014; 55:101-105.
  25. Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Lennon L, Sattar N. Obesity and risk of incident heart failure in older men with and without pre-existing coronary heart disease: does leptin have a role? *J Am Coll Cardiol*. 2011; 58:1870-7.
  26. Rippe JM, Angelopoulos TJ. Sugars, obesity, and cardiovascular disease: results from recent randomized control trials. *Eur J Nutr*. 2016; 55:45-53.
  27. Ren SY, Xu X. Role of autophagy in metabolic syndrome-associated heart disease. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1852:225-31.
  28. He C, Bassik MC, Moresi V, Sun K, Wei Y, Zou Z, An Z, Loh J, Fisher J, Sun Q, Korsmeyer S, Packer M, May HI, Hill JA, Virgin HW, Gilpin C, Xiao G, Bassel-Duby R, Scherer PE, Levine B. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*. 2012; 481:511-5.
  29. Wang H, Sun RQ, Zeng XY, Zhou X, Li S, Jo E, Molero JC, Ye JM. Restoration of autophagy alleviates hepatic ER stress and impaired insulin signalling transduction in high fructose-fed male mice. *Endocrinology*. 2015; 156:169-81.
  30. Bando S, Fukuda D, Soeki T, Nishimoto S, Uematsu E, Matsuura T, Ise T, Tobiume T, Yamaguchi K, Yagi S, Iwase T, Yamada H, Wakatsuki T, Shimabukuro M, Sata M. Expression of NLRP3 in subcutaneous adipose tissue is associated with coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2015; 242:407-14.
  31. Paramel Varghese G, Folkersen L, Strawbridge RJ, Halvorsen B, Yndestad A, Ranheim T, Krohg-Sørensen K, Skjelland M, Espevik T, Aukrust P, Lengquist M, Hedin U, Jansson JH, Fransén K, Hansson GK, Eriksson P, Sirsjö A. NLRP3 Inflammasome Expression and Activation in Human Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2016; 5. pii: e003031.
  32. Bullón P, Cano-García FJ, Alcocer-Gómez E, Varela-López A, Roman-Malo L, Ruiz-Salmerón RJ, Quiles JL, Navarro-Pando JM, Battino M, Ruiz-Cabello J, Jiménez-Borreguero LJ, Cordero MD. Could NLRP3-inflammasome be a cardiovascular risk biomarkers in Acute Myocardial Infarction Patients? *Antioxid Redox Signal*. 2016. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6970>.
  33. Youm YH, Adijiang A, Vandanmagsar B, Burk D, Ravussin A, Dixit VD. Elimination of the NLRP3-ASC inflammasome protects against chronic obesity-induced pancreatic damage. *Endocrinology*. 2011; 152:4039-45.
  34. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004; 291:1730-1737.
  35. Winnik S, Auwerx J, Sinclair DA, Matter CM. Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *ur Heart J*. 2015; 36:3404-12.
  36. Krishnan SM, Dowling JK, Ling YH, Diep H, Chan CT, Ferens D, Kett MM, Pinar A, Samuel CS, Vinh A, Arumugam TV, Hewitson TD, Kemp-Harper BK, Robertson AA, Cooper MA, Latz E, Mansell A, Sobey CG, Drummond GR. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *Br J Pharmacol*. 2016; 173:752-65.
  37. Stout-Delgado HW, Cho SJ, Chu SG, Mitzel DN, Villalba J, El-Chemaly S, Ryter SW, Choi AM, Rosas IO. Age-Dependent Susceptibility to Pulmonary Fibrosis Is

Associated with NLRP3 Inflammasome Activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016; 55:252-63.

38. Wree A, McGeough MD, Peña CA, Schlattjan M, Li H, Inzaugarat ME, Messer K, Canbay A, Hoffman HM, Feldstein AE. NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med (Berl)*. 2014; 92:1069-82.
39. Tanno M, Kuno A, Horio Y, Miura T. Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic Res Cardiol*. 2012; 107:273.
40. Zhang Y, Sauler M, Shinn AS, Gong H, Haslip M, Shan P, Mannam P, Lee PJ. Endothelial PINK1 mediates the protective effects of NLRP3 deficiency during lethal oxidant injury. *J Immunol*. 2014; 192:5296-304.
41. Abderrazak A, Couchie D, Mahmood DF, Elhage R, Vindis C, Laffargue M, Matéo V, Büchele B, Ayala MR, El Gaafary M, Syrovets T, Slimane MN, Friguet B, Fulop T, Simmet T, El Hadri K, Rouis M. Anti-inflammatory and antiatherogenic effects of the NLRP3 inflammasome inhibitor arglabin in ApoE2. *Ki mice fed a high-fat diet*. *Circulation*. 2015; 131:1061-70.
42. Toldo S, Marchetti C, Mauro AG, Chojnacki J, Mezzaroma E, Carbone S, Zhang S, Van Tassell B, Salloum FN, Abbate A. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse. *Int J Cardiol*. 2016; 209:215-20.
43. van Hout GP, Bosch L, Ellenbroek GH, de Haan JJ, van Solinge WW, Cooper MA, Arslan F, de Jager SC, Robertson AA, Pasterkamp G, Hoefer IE. The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2016. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw247>.
44. Jimenez-Gomez Y, Mattison JA, Pearson KJ, Martin-Montalvo A, Palacios HH, Sossong AM, Ward TM, Younts CM, Lewis K, Allard JS, Longo DL, Belman JP, Malagon MM, Navas P, Sanghvi M, Moaddel R, Tilmont EM, Herbert RL, Morrell CH, Egan JM, Baur JA, Ferrucci L, Bogan JS, Bernier M, de Cabo R. Resveratrol improves adipose insulin signaling and reduces the inflammatory response in adipose tissue of rhesus monkeys on high-fat, high-sugar diet. *Cell Metab*. 2013; 18:533-45.
45. Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem*. 1992; 202:384-38.